

# *Bijdrage*

TOT DE KENNIS VAN DE  
CASEÏNAAT PHOSPHAAT-PHASE  
DER MELK

---

P. van der Burg

VN08201, 136



# Bijdrage tot de kennis van de caseinaat phosphaat- phase der melk

---

## PROEFSCHRIFT

tot verkrijging van den graad van  
DOCTOR IN DE LANDBOUWKUNDE

op gezag van den Rector-Mag-  
nificus Dr Ir S. C. J. Olivier,  
hoogleraar in de Scheikunde,  
te verdedigen tegen de beden-  
kingen van een commissie uit  
den Senaat der Landbouwhoge-  
school te Wageningen op  
Maandag 24 Juni 1946 te 3 uur

door

P. van der Burg



*Het is de goede gewoonte dat op deze plaats diegenen worden genoemd aan wie de promovendus dank wil brengen voor hun bijdrage tot zijn wetenschappelijke vorming.*

*Hooggeleerde van der Burg, geachte Promotor.*

*Hoewel ik niet tot Uw leerlingen heb behoord, ben ik U grooten dank verschuldigd voor de wijze waarop en de belangstelling waarmee U mijn proefschrift heeft willen aanvaarden.*

*In diepen eerbied wil ik hier wijlen Dr. G. S. de Kadt gedenken. Allen die hem hebben gekend zullen het betreuren dat deze veelomvattende, scherp analyseerende geest aan de zuivelwetenschap werd ontrukkt.*

*Hooggeleerde Bungenberg de Jong.*

*Uw buitengewoon heldere en eenvoudige uiteenzettingen van de meest ingewikkelde vraagstukken, stempelen U tot een primus inter pares. Het voorrecht met U gedurende de laatste jaren geregeld contact te hebben gehad kan door mij niet hoog genoeg gewaardeerd worden.*

*Zeergeleerde ter Horst, waarde Mies, de buitengewoon prettige samenwerking met jou heeft veel bijgedragen tot de voltooiing van dit proefschrift.*

*Waarde van Minnen, door je groote ervaring in melkanalyses en tevens door je belangstelling in het onderzoek, mag het aandeel dat je in het tot stand komen van dit proefschrift hebt zeer zeker groot genoemd worden.*

*Tenslotte, doch zeker niet het minst, wil ik hier den heer S. Hepkema, directeur der Coöperatieve Condensfabriek „Friesland” mijn dank betuigen, zonder wiens toestemming de resultaten van dit onderzoek niet gepubliceerd hadden mogen worden.*



INHOUD	pg
INLEIDING	7
HOOFDSTUK I	
Samenstelling der melk	8
De verdeeling der constituenten over de fasen	8
HOOFDSTUK II. De caseïne	
Homogeniteit van caseïne	10
Elementaire analyse	10
Moleculairgewicht	10
De aminozuren	11
De reactieve groepen	11
HOOFDSTUK III. De caseïnaatfase in melk	14
Literatuur overzicht	
HOOFDSTUK IV. Het verhitten van melk met gisten	33
Oriënterende proeven	33
Beschrijving der toegepaste methode	33
Betrouwbaarheid der methode	34
Behandeling der gist met loog	36
Invloed der hoeveelheid gist	37
De duur van de verwarming	39
Invloed van citraat en suikertoevoeging	41
Discussie der verkregen resultaten	42
HOOFDSTUK V. Verhitten van melk zonder gisten	43
HOOFDSTUK VI. Super centrifugeeren van verhitte melk	45
Inleiding	45
Toestand van verhitte albumine in melk	45
Analyse-methoden voor gecentrifugeerde melk	46
Analyse der verhitte melk	47
Discussie der resultaten	47
Het verminderde gehalte aan opgeloste kalk en fosfaat	48
Discussie der verkregen resultaten	48
HOOFDSTUK VII. Adsorptie van caseïne aan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	51
Oriënterende proef	51
Quantitatieve proef	51
Invloed zouttoevoeging	53
Invloed pH	53
Invloed formaline-toevoeging	54
Discussie der resultaten	55
HOOFDSTUK VIII. Oxalaattitratie van verhitte melk	57
Oriënterende proef	57
Titratie van melk met en zonder gist verhit	58
Discussie der verkregen resultaten	59
HOOFDSTUK IX. Werkhypothese	60
Lichtverstrooiing	62
Veranderingen bij matige verwarming	65
De stremtijd	66
Veranderde oprooming	68
Verdunnen van melk	69
SAMENVATTING	71



# Stellingen

## I

De opvatting, dat door het inwerken van formaline op een eiwit, het isoelectrisch punt daarvan moet veranderen, is in het algemeen onjuist.

Eilers, Rapport der B.P.M., F.N.Z., 1943 pg. 26

## II

De verzachtende werking van melk op de smaak van koffie is niet alleen een gevolg van het vet, noch alleen van het eiwit, doch moet aan de combinatie van deze twee melkcomponenten worden toegeschreven.

## III

De vertraagde oprooming bij lang- en diepgekoelde melk is niet of slechts voor een gering deel toe te schrijven aan de fysische toestand van het melkvet.

Dit Proefschrift, pg. 68

## IV

Homogenisatie van rauwe volle melk heeft niet alleen een desintegratie der vetbolletjes tengevolge, ook in de vetvrije phase worden veranderingen aangebracht.

## V

De opvatting van Pasveer, dat het diacetyl niet de hoofdcomponent is van het boteraroma, wordt niet door doeltreffende argumenten gesteund en moet onjuist worden geacht.

Diss. Pasveer, 1941 pg. 128

## VI

Bij de tabaksfermentatie hebben bacteriën een belangrijke rol te vervullen.

## VII

Met de huidige, de tropische landbouw ten dienste staande middelen, is het zeer waarschijnlijk te achten, dat de in de Deli tabakscultuur gebruikelijke 8-jarige reboisatie-periode aanmerkelijk kan worden ingekort.

## VIII

Nu de aardappelrooimachines, die de aardappelen schoon in zak, mand of kar moeten afleveren, op grotere schaal gemaakt worden, zal de vervolmaking dezer machines, in een sneller tempo dan tot nu toe, verwacht kunnen worden.



## INLEIDING

Hoewel de minerale bestanddeelen der melk reeds lang zijn onderzocht en geanalyseerd, is de combinatie der afzonderlijke zure en basische constituenten nog steeds niet afdoende opgehelderd.

Het feit, dat sommige van deze constituenten zoowel in opgeloste toestand alsook in colloïdale vorm, in organische- en anorganische combinatie voorkomen, maakt het systeem wel zeer ingewikkeld. Zoo komen Ca, Mg en  $\text{PO}_4$  opgelost en colloïdaal voor in melk, terwijl Ca en P ook in combinatie met caseïne en wat P betreft ook met vetachtige stoffen voorkomen.

De zoogenaamde zoutbalans is van groote beteekenis bij de bereiding van verschillende zuivelproducten.

In het onderhavige onderzoek werd getracht een inzicht te verkrijgen in de veranderingen, die de verschillende bestanddeelen der melk bij het verwarmen ondergaan en wel werd speciale aandacht geschonken aan de toestand van de caseïne, Ca en  $\text{PO}_4$  in het systeem melk.

Immers, 't voornaamste eiwit in melk is de caseïne en deze komt hierin voor als calciumzout, terwijl dit eiwit bovendien nog een zekere hoeveelheid calciumphosphaat bevat. De meerwaardige ionen bepalen in een colloïdaal systeem voornamelijk de stabiliteit en wel zullen de negatieve meerwaardige ionen, te weten phosphaat en citraat, de in melk negatief geladen caseïne een verhoogde, de meerwaardige positieve ionen Ca en Mg een verlaagde stabiliteit verleen.

Het bestaan van colloïdaal calciumphosphaat heeft men reeds lang ingezien, zooals uit de literatuur blijkt, doch tevens volgt uit de gegevens, dat men het in geen deele eens is over de vraag of dit colloïdale phosphaat secundair of tertiair, dus als  $\text{CaHPO}_4$  of als  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  aanwezig is.

Verder lopen de meeningen zeer uiteen over de vorm, waarin dit colloïdale phosphaat aan de caseïne is gebonden, waarbij men eenerzijds een verdediging aantreft van een chemische binding, anderzijds de opvatting huldigt, dat caseïne als beschuttend colloïd zou fungeeren.

Om hierin meer inzicht te krijgen, werd in ons onderzoek gebruik gemaakt van de speciale eigenschap van sommige micro-organismen, dat bij verwarming van melk bij aanwezigheid dezer micro-organismen een overdracht van calciumphosphaat plaats vindt uit het systeem melk op deze organismen. Dit verschijnsel werd door Guittonneau en Brigando (1) in 1936 ontdekt bij een onderzoek, dat zij instelden naar de kleurbaarheid van microben, die tezamen met melk waren verhit.



## HOOFDSTUK I.

### Samenstelling der melk.

Melk is een secretieproduct van de melkklieren der vrouwelijke zoogdieren en is dus een biologische vloeistof.

Dit brengt met zich mede, dat er procentueele verschillen zullen zijn in de samenstellende componenten en men geen bepaalde analyse van melk kan opstellen. De samenstelling wisselt niet alleen bij de verschillende species, doch ook bij het individu. Het is hier niet de plaats daar verder op in te gaan, maar bij een studie over melk, waarbij wij koemelk bedoelen, is het wel noodzakelijk een inzicht in de samenstelling te hebben. Wij kunnen daarbij echter slechts gemiddelde cijfers opgeven. In het algemeen kan men zeggen, dat melk bestaat uit ongeveer 88 % water, 3,35 % vet, 4,5 % lactose, 3.25 % eiwitten, 0.9 % zouten. De eiwitten van koemelk laten zich verdelen in caseïne (2,7 %), albumine (0,5 %) en globuline (0,05 %).

De zouten bestaan uit citroenzure en minerale constituenten. Aan Rogers (90) ontleen ik de volgende cijfers, waarin de voornaamste zoutcomponenten in grammen per liter zijn meegedeeld:

K <sub>2</sub> O	1,80
Na <sub>2</sub> O	0,72
CaO	1,78
MgO	0,30
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1,50
citroenzuur	2,00
Cl	1,00
SO <sub>3</sub>	0,11

Naast deze bestanddeelen komen in kleinere hoeveelheden voor ijzer, koper, zink, aluminium, mangaan en jodium, en sporen silicium, borium, vanadium, rubidium, lithium en strontium.

#### De verdeling der constituenten over de verschillende fasen in melk.

Belangrijker dan een opsomming der aanwezige elementen is natuurlijk de chemische combinatie, waarin deze zoutconstituenten in melk voorkomen. Hieromtrent is onze kennis nog zeer onvoldoende en het probleem is wel zeer ingewikkeld door het feit, dat er combinaties met de melkeiwitten optreden, door de colloïdale natuur van verscheidene zouten en ten slotte doordat wij van de meeste ionen niet weten in welke concentratie zij aanwezig zijn. Men moet steeds bedenken, dat melk een heterogeen systeem is. Men kan de constituenten in drie klassen verdeelen:

- 1e die welke geheel opgelost zijn,
- 2e die welke gedeeltelijk opgelost en gedeeltelijk in suspensie zijn,
- 3e die welke geheel in suspensie zijn.

Vele pogingen zijn gedaan om zoutcombinaties op te stellen voor de constituenten in ware oplossing, maar niet alleen doet het bestaan van ionenevenwichten een classificatie op moleculair standpunt reeds van tevoren teniet, maar ook compliceert de heterogeniteit van het systeem melk verder het probleem.

Melk moet dus worden opgevat als een colloïdaal systeem met verschillende fasen, die in dispersiegraad uiteenloopen.

De continue phase bestaat uit water, waarin opgelost lactose, verschillende zouten en oplosbare eiwitten; de gesuspendeerde



phase komt in zeer fijne verdeling voor, zooals calciumcaseïnaat calciumphosphaat en vet. Hoewel albumine en globuline oplosbaar worden genoemd, omdat ze een heldere oplossing vormen met de continue phase, is hun dispersie niet homogeen met die der opgeloste zouten en lactose. De albumine en globuline moleculen zijn wel amicroscopisch, doch zij passeeren geen dierlijke membranen en zijn dus relatief groot ten opzichte der kristalloïden, die gemakkelijk diffundeeren.

Het zal duidelijk zijn, dat de verdeling van de elementen over de fasen in melk reeds lang de aandacht heeft getrokken. De pH van het stelsel heeft natuurlijk groote invloed hierop, daar hierdoor de ladingstoestand van het eiwit wordt bepaald, benevens de oplosbaarheid van verschillende zouten. Wanneer wij dus genoemde verdeling over de fasen bij rauwe melk willen nagaan, dienen wij dit te doen bij de natuurlijke pH van melk en moeten wij zorgdragen, dat de scheiding onder zoo gering mogelijke veranderingen in de melk plaats vindt.

Men heeft hiervoor toegepast: de stremming door leb, ultrafiltratie, centrifugeering en dialyse.

Bij de eerste drie methoden wordt de caseïnephase van de wei gescheiden en door analyse der beide componenten kan men een inzicht over de combinatie van het eiwit met de melkzouten verkrijgen.

Bij dialyse moeten wij rekening houden met het feit, dat de negatief geladen eiwitdeeltjes niet door het membraan diffundeeren, zoodat zich een Donnanevenwicht zal instellen.

Het blijkt uit de onderzoekingen, dat Na, K en Cl niet aan de caseïne zijn gebonden en dus geheel opgelost in de wei voorkomen. (De Kadt 25).

Het citroenzuur, dat altijd geheel opgelost werd geacht, blijkt ook voor een gedeelte aan de caseïnephase te zijn gebonden en wel ongeveer in een hoeveelheid van 0.02 mmol. per gram caseïne. (De Kadt, Eilers 58).

Vele onderzoekers hebben hun krachten beproefd op het vraagstuk betreffende de verdeling van Ca en  $\text{PO}_4$  in melk. Door analyse en lebstromming vond Ling (24) dat van het totale gehalte aan Ca gemiddeld 33,26 % opgelost aanwezig is. Van Slyke & Bosworth (93) vonden bij ultrafiltratie gemiddeld 32,96 %, zoodat deze cijfers zeer goed overeenstemmen.

In de melk komt dus het Ca ongeveer voor  $\frac{1}{3}$  opgelost voor, terwijl het resteerende  $\frac{2}{3}$  gedeelte op een of andere wijze aan de caseïne is gebonden.

Met behulp van ultrafiltratie vonden van Slyke & Bosworth, dat van het totale gehalte aan P, 27 — 64 % in het serum aanwezig zou zijn, terwijl Wardlaw (94) door dialyse vond, dat deze gehalten tusschen 35 en 55 % schommelen.

Bij scheiding met het lebferment vond Ling, dat gemiddeld 51,5 % opgelost is.

Daar de afmetingen der deeltjes hun physische toestand en hun physisch-chemische eigenschappen grootendeels bepalen, is het gewenscht over die afmetingen een globaal overzicht te geven. De volgende cijfers zijn ontleend aan Wiegner (91):

#### Grootte der melkbestanddeelen:

Vetbolletjes	10	- 1,6	mu
Calciumcaseïnaatcalciumphosphaatdeeltjes	0,1	- 0,005	„
Lactalbumine	0,015	- 0,005	„
Lactose	0,0019	- 0,0007	„
Zoutionen	0,00005	- 0,0004	„



## HOOFDSTUK II

### De Caseïne.

Onder caseïne wordt hier verstaan die eiwitfractie van de rauwe melk, die door aanzuren tot een pH van ongeveer 4,6 precipiteert.

Caseïne behoort tot die groep van organische verbindingen, die bekend zijn onder de naam „eiwitten”.

Deze eiwitten zijn zonder twijfel de meest complexe verbindingen, waarmee men in de chemie te doen heeft.

Op voorstel van het Committee on Protein Nomenclature (71) worden de eiwitten verdeeld in enkelvoudige eiwitten, die bij hydrolyse slechts aminozuren of derivaten hiervan opleveren, en samengestelde eiwitten, die niet alleen in aminozuren uiteenvallen.

Tot deze laatste behoort de caseïne, daar bij hydrolyse ook phosphorzuur vrijkomt en hierdoor wordt de caseïne gerekend tot de ondergroep der phosphorproteïnen.

### Homogeniteit van caseïne.

In de laatste decennia is gebleken, dat caseïne, die door precipitatie bij pH 4,6 uit de melk is verkregen, geen enkelvoudige homomoleculaire stof is. Dit blijkt uit de onderzoeken van Osborne en Wakeman (84), Linderstrøm-Lang (85), Cherbuliez, c.s. (86), Groh (87) en anderen, op wier techniek hier niet verder zal worden ingegaan.

Door deze onderzoekers werd de caseïne in verschillende componenten gefractionneerd, die verschillend in eigenschappen bleken te zijn. Wanneer deze componenten echter weer werden samengevoegd, zou het mengsel weer de oorspronkelijke eigenschappen van caseïne verkregen hebben.

Hierin wordt wel een bevestiging gezien van de theorie van Sørensen (88), dat de eiwitten uit verschillende complexen zouden bestaan, waarbinnen de atomen door hoofdvalenties met elkaar zijn verbonden. De complexen onderling zouden het eiwitsysteem opbouwen door restvalenties en wel zoodanig, dat deze reversibel dissocieerbaar zijn.

Daar echter nooit is gebleken, dat deze fracties van caseïne in melk als afzonderlijke bestanddeelen voorkomen, zullen wij de caseïne als een homogene stof behandelen.

### Elementair analyse.

Aan Sutermeister (72) worden hier eenige elementair analyses ontleend zooals deze door verschillende onderzoekers vermeld zijn.

	C	H	N	S	P	O
Hammarsten (73)	52,96	7,05	15,65	0,72	0,85	22,77
Lehmann (5)	54,00	7,04	15,60	0,77	0,85	21,74
Tangl (74)	52,69	6,76	15,65	0,83	0,88	23,19

### Het moleculairgewicht.

Het moleculairgewicht van caseïne is nog nooit nauwkeurig vastgesteld.

Svedberg & Carpenter en Carpenter (75) bestudeerden het moleculairgewicht van caseïne met behulp van de ultracentrifuge. Zij constateerden, dat caseïne volgens Hammarsten een mengsel was van eiwitdeeltjes met verschillend micellairge-



wicht, waarbij de fractie met een micellairgewicht van 75.000 tot 100.000 domineerde.

Philpot & Philpot (76) centrifugeerden met oxalaat ontkalkte melk, waardoor caseïne verkregen werd waarvan de deeltjes homogeen in grootte zijn. Zij kwamen ongeveer tot dezelfde waarden als Svedberg en medewerkers.

### De aminozuren.

Een groot aantal onderzoekers heeft zich bezig gehouden met de vraag welke aminozuren het caseïne-molecule opbouwen en hoewel soms uiteenlopende resultaten werden verkregen, al naar gelang van de toegepaste methode en nog nooit een sluitende balans werd verkregen tusschen de gevonden en de theoretische opbrengst, heeft men wel een vrij aardig inzicht in de hoeveelheden der verschillende aminozuren verkregen, die het molecule opbouwen. Een 23-tal aminozuren werden geïsoleerd.

Met Waldschmidt-Leitz (65) wordt algemeen aangenomen, dat deze bouwsteen tot lange ketens gegroepeerd zijn door de peptidebinding - NH - CO -.

Over de rangschikking dezer aminozuren in het molecule is nog niets bekend, al zal hierin zeker wel een regelmaat optreden.

Immers, door de onderzoeken van Linderstrøm-Lang (78) over clupeïne is gebleken, dat bij dit eenvoudige eiwit de aminozuren in een bepaalde regelmaat gerangschikt liggen.

Ook door Bergmann (79) en Bergmann & Niemann (77) wordt dit denkbeeld, dat de aminozuren in regelmatige orde gerangschikt zijn, naar voren gebracht.

Zij berekenden de verhouding, waarin de aminozuren in een eiwit voorkwamen en komen zoo tot het totale aantal aminozuren, dat in het molecule aanwezig moet zijn.

Zoo vonden zij bij ei-albumine, dat glutaminezuur met een frequentie van 1 : 8, asparaginezuur 1 : 18, methionine, lysine en arginine 1 : 24, tyrosine 1 : 36 en histidine en cysteine 1 : 72 voorkomt.

Als som der aminozuurmoleculen vonden zij 288, zoodat een molecule ei-albumine 288 of een veelvoud hiervan aan aminozuurmoleculen moet bevatten.

Op dezelfde wijze berekenden zij dit haemoglobine 576 of  $2 \times 288$ , fibroïne 2597 of  $9 \times 288$  aminozuren bevat.

Zij besluiten uit hun cijfers, dat zoowel het totale aantal aminozuren, als het aantal afzonderlijke zuren en de frequentie der afzonderlijke zuren alle machten zijn van 2 en van 3, die voorgesteld kunnen worden door  $2^n \times 3^m$ , waarin n en m geheele getallen zijn.

Uit deze regelmaat bouwen zij een theorie op over de rangschikking der verschillende aminozuren in het molecule en wel zou ieder zuur terugkomen na een bepaald aantal andere aminozuren.

Door het ontbreken van accuraat analytisch materiaal kon een dergelijk periodiek patroon voor caseïne nog niet worden opgesteld, maar het is haast wel zeker, dat dit ook hier zal bestaan.

### De reactieve groepen.

Caseïne bestaat dus uit een groot aantal aminozuren, die door de peptidebinding aan elkaar zijn gehecht.

De actieve groepen van het alpha-koolstofatoom, n.l. de carboxyl- en de aminogroepen, die deze band vormen, verliezen hierdoor dus hun karakteristieke eigenschappen.



De basische en zure aminozuren, die dus een zure of basische groep overhouden, verleenen aan de caseïne haar chemische eigenschappen. Als zure groep fungeert ook het in de caseïne veresterd phosphorzuur, terwijl de eindstandige carboxyl- en aminogroep, welke niet meer in het polypeptideschema worden opgenomen, wel als reactieve groepen aanwezig zijn, doch het aantal van deze laatste groepen is relatief zóó gering, dat wij ze kunnen verwaarlozen.

Door deze basische en zure groepen reageert de caseïne dus als een amphoteer-electrolyt en wel in alkalisch milieu gedraagt het zich als een zuur en heeft een negatieve lading, in voldoende zuur milieu gedraagt het zich als base en draagt een positieve lading.

Bij het iso-electrisch punt, dat ongeveer bij pH 4,6 ligt, gaat de eene vorm in de ander over en is het deeltje dus ongeladen.

Volgens de theorie van Bjerrum (66) is bij dit punt de dissociatie der positieve en negatieve groepen even groot, zoodat het „Zwitterion” als geheel ongeladen is.

Het phosphorzuur is een integraal bestanddeel van het caseïne-molecule. Posternak (67) maakte als eerste de veronderstelling, gebaseerd op de analyse der brokstukken, die hij bij tryptische afbraak van caseïne verkreeg, dat het phosphorzuur in de caseïne veresterd zou zijn aan een OH-groep.

Rimington & Kay (80) en Rimington (68) vonden, dat trypsine de phosphor van caseïne snel afsplitst in de vorm van een peptonachtige verbinding, die verder langzaam wordt gehydrolyseerd en dan anorgaanisch phosphorzuur levert.

Twee derde van de phosphor komt van dit phosphopepton als phosphorzuur vrij door inwerking van Robison's (81) beenderphosphatase, welk enzym geen inwerking op de caseïne zelf uitoefent. De overblijvende phosphor wordt afgesplitst door de esterase uit nierextracten.

De caseïne fractie die de phosphor bevatte, bestond uit 3 aminozuren, waaronder serine voorkwam.

Levene & Hill (69) en Schmidt (82) isoleerden een phosphordipeptide, glutamineserinephosphaat en ten slotte bewees Lipmann (70) door de isolatie van serinephosphorzuur uit caseïne door hydrolyse met 2,5 - normaal zoutzuur dat het phosphorzuur aan de OH-groep van het serine was veresterd.

Men heeft dus in de caseïne als reactieve groepen de carboxyl-, amino- en phosphorzuurgroepen.

De mate, waarop deze groepen aan eventueele reacties deelnemen, blijkt uit het volgende.

De dissociatie van een zwak zuur in waterige oplossing kan worden voorgesteld als:

$$[H] \times [Z] = K [HZ] \quad (1)$$

waarin [HZ] de concentratie van het ongedissocieerde zuur, [H] en [Z] die van de twee ionen voorstellen, waarin het ioniseert. Men kan ook schrijven:

$$[H] = K \frac{[HZ]}{[Z]} \quad (2)$$

Wanneer de helft van het zuur met een sterke base geneutraliseerd wordt, is de concentratie van het overgebleven zuur gelijk aan die van het gevormde zout:

$$[HZ] = [Z] \text{ en } \frac{[HZ]}{[Z]} = 1$$



Hieruit volgt bij substitutie in (2), dat:

$$[H] = K$$

of bij halve neutralisatie van een zwak zuur is de waterstof-ionenconcentratie numeriek gelijk aan de dissociatieconstante. Eveneens geldt dat bij titratie van een zwakke base bij halve neutralisatie, de hydroxylionenconcentratie gelijk is aan de dissociatieconstante der base.

Men is nu om praktische redenen gewoon, de H<sup>+</sup>-ionenconcentratie uit te drukken in de negatieve logarithme. Het geeft eveneens praktische voordeelen de dissociatieconstante in diezelfde eenheid uit te drukken.

Bij ampholyten hebben wij met eenzelfde verbinding met zure en basische groepen naast elkaar te maken. Nu is het heel goed mogelijk een dissociatie van een base als een dissociatie van een zuur op te vatten. Wij kunnen dan een schijnbare dissociatieconstante berekenen, die echter niet gelijk is aan de werkelijke dissociatieconstante van de base, maar die wel het voordeel heeft bij halve neutralisatie van het schijnbare zuur gelijk te zijn aan de pH, wat meer sprekend is dan de ongebruikelijke pOH, waaraan de werkelijke dissociatieconstante der basegroep gelijk is. Het verband tusschen de ware- ( $K_b$ ) en schijnbare ( $K_z$ ) dissociatieconstante wordt gegeven door de betrekking:

$$K_b \times K_z = K_w$$

waarin  $K_w$  = de dissociatieconstante van water bij 22° C.

Op deze wijze zijn voor 1923, toen het begrip Zwitterion zijn intrede deed, de basische en zure groepen verwisseld. In de volgende tabel, waarin enkele gegevens over de dissociatieconstanten van de voornaamste aminozuren van caseïne zijn verzameld, sluiten wij ons aan bij het moderne gebruik, dat van de zure groepen der ampholyten de ware  $K$ , van de basische groepen echter de schijnbare  $K$  geeft. De waarden zijn in hoofdzaak ontleend aan C.L.A. Schmidt's Chemistry of Amino Acids, aan Eilers (58), die de sterkte bepaalde van de phosphorzure esters, en aan Lloyd & Shore (83), en betreffen de sterkte-exponent van die groepen, die niet in de peptidebinding zijn opgenomen.

	Zure groepen	Basische groepen
Asparaginezuur	3,87	
Glutaminezuur	4,28	
Oxyglutaminezuur	4,24	
Tyrosine	10,3	
Primaire fosphaatgroep	2,2	
Secundaire fosphaatgroep	6,5	
Hystidine		5,9 - 6,1
Lysine		10,53
Arginine		12 à 13

Versche melk heeft een pH van ongeveer 6,7 en met de gegevens over de sterkte-exponenten voor oogen is het dus duidelijk, dat aan de zoutvorming in melk deel zullen hebben: de carboxylgroepen van asparagine-, glutamine- en oxyglutaminezuur en de primaire en secundaire fosphaatgroepen, terwijl van de basen deelnemen lysine en arginine. Het melkserum bevat voornamelijk Na, K, Ca, Mg, fosphaat, citraat en chloriden.

Nu zijn de caseïnatën der aardalkalimetalen veel minder gedissocieerd dan die der alkalimetalen, zoodat de caseïne in melk bijna geheel als calciumzout zal voorkomen.



### HOOFDSTUK III

#### De caseïnaatphosphaatphase in melk.

##### Literatuuroverzicht.

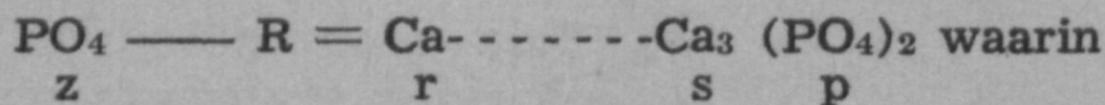
De caseïne, het voornaamste eiwit der melk, komt hierin voor als calciumzout in vrij grof disperse vorm.

Uit de literatuur blijkt, dat men reeds lang heeft ingezien, dat dit calciumcaseïnaat een zekere hoeveelheid calciumphosphaat colloïdaal in oplossing hield. Men is het er echter niet over eens of dit colloïdale phosphaat secundair of tertiair aanwezig is en bovendien lopen de meeningen zeer uiteen over de vraag of dit colloïdale phosphaat chemisch aan de caseïne gebonden voorkomt, of dat de caseïne de rol speelt van een beschuttend colloïd t. o. v. dit calciumphosphaat.

Alvorens tot de literatuurbespreking over te gaan, komt het mij gewenscht voor hier duidelijk uiteen te zetten wat met de volgende gebruikte termen wordt bedoeld.

In de onderscheidene publicaties over de calcium- en phosphorhuishouding in melk worden verschillende namen en omschrijvingen aangetroffen om aan te duiden welke kalk of phosphor men op een gegeven moment bedoelt. Dit werkt vaak verwarrend. Ik heb gemeend de leesbaarheid van deze publicatie te kunnen vergrooten door mij aan het volgende schema te houden.

Door lebstreaming, ultrafiltreeren en ultracentrifugeeren wordt het onoplosbare gedeelte van (vetvrije) ondermelk gescheiden van de continue phase met de daarin opgeloste melkbestanddeelen. Dit onoplosbare gedeelte, in casu de caseïne, zal blijken te bestaan uit calciumcaseïnaat, dat op een of andere wijze calciumphosphaat aan zich heeft gebonden. Dit calciumphosphaat blijkt grootendeels, zoo niet geheel als tertiair zout aanwezig te zijn. Dit onoplosbare gedeelte stel ik voor door het volgende schema:



z = het in de caseïne, aan serine veresterde phosphaat: het esterphosphaat.

r = het calcium, dat met de caseïne het caseïnaat vormt bij de pH der melk: het caseïnecalcium.

s = het triphosphaatcalcium.

p = het triphosphaat  $\text{PO}_4$ .

r+s = totale onoplosbare calcium.

z+p = totale onoplosbare  $\text{PO}_4$ .

Naast dit calciumcaseïnaatcomplex komen in de melk Ca en  $\text{PO}_4$  voor in de continue phase. Dit is het opgeloste calcium en opgeloste phosphaat.

Hammarsten (3) was de eerste, die zich met het colloïdale phosphaat bezig hield. Hij veronderstelde, dat het door het calciumcaseïnaat in oplossing werd gehouden.

Söldner (4) komt tot de conclusie, dat zoowel di- als triphosphaat in de melk voorkomen, het diphosphaat meer dan het triphosphaat, en verwerpt de hypothese van een chemische binding tusschen caseïne en de fosphaten.

Lehmann (5) meende, dat het phosphaat als het tricalciumzout aanwezig zou zijn en in de vorm van een dubbelzout gebonden aan het calciumzout der caseïne in de melk zou voorkomen.



Langer zullen wij stilstaan bij de studie van Van Slyke & Bosworth (6). Deze onderzoekers maakten, evenals Lehmann en Söldner, gebruik van een ultrafilter, om de opgeloste melkbestanddeelen van de gesuspendeerde te scheiden. Zij trachtten zoo na te gaan of de caseïne alleen als calciumzout voorkomt of dat nog een andere base in het spel is, en ook of de kaasstof een zuur of een neutraal zout is, en ten slotte of de onoplosbare phosphaten in verbinding staan met de caseïne of niet.

Zij analyseerden hiertoe een 16-tal monsters melk van 13 koeien en tevens de ultrafiltraten dier melk, met het volgende resultaat, aangegeven in tabel III.

**Tabel III.**  
**Amounts of proteins, casein and phosphorus in milk.**

Cow No.	Stage of lact.	Casein %	Phosphorus					Ratio of organic to insoluble inorganic phosphate z/p
			Total %	Soluble %	Insoluble			
					Total % (z+p)	Organic in cas. % z	Inorganic (phosphate) % p	
1	3 ds.	3,48	0,1272	0,0818	0,0454	0,0247	0,0207	1:0,83
2	1 mo.	2,73	0,1150	0,0595	0,0555	0,0194	0,0361	1:1,86
3	1 mo.	2,78	0,1010	0,0494	0,0516	0,0197	0,0319	1:1,62
3	11 mo.	4,09	0,1111	0,0536	0,0575	0,0290	0,0285	1:0,98
4	3 mo.	3,09	0,1278	0,0563	0,0715	0,0219	0,0496	1:2,26
5	3 mo.	2,88	0,0943	0,0475	0,0468	0,0204	0,0264	1:1,29
5	7 mo.	2,70	0,0870	0,0334	0,0536	0,0192	0,0344	1:1,79
6	5 mo.	2,92	0,1008	0,0356	0,0652	0,0207	0,0445	1:2,15
7	6 mo.	3,40	0,1063	0,0548	0,0515	0,0241	0,0274	1:1,14
7	10 mo.	3,56	0,1010	0,0340	0,0670	0,0253	0,0417	1:1,65
8	7 mo.	3,58	0,1157	0,0550	0,0607	0,0254	0,0353	1:1,39
9	8 mo.	3,47	0,1036	0,0364	0,0672	0,0246	0,0426	1:1,73
10	9 mo.	3,10	0,1097	0,0610	0,0487	0,0220	0,0267	1:1,22
11	10 mo.	3,36	0,1090	0,0434	0,0656	0,0239	0,0417	1:1,74
12	11 mo.	3,14	0,1060	0,0286	0,0774	0,0223	0,0551	1:2,47
13	12 mo.	3,97	0,1310	0,0442	0,0868	0,0353	0,0515	1:1,46

Uit deze gegevens concludeerden de auteurs, dat een chemische binding tusschen de caseïne en de phosphaten niet kon bestaan. Immers, zoo er een chemische band zou bestaan, zou er een bepaalde uniforme betrekking moeten bestaan tusschen het esterphosphaat (z) der caseïne en het triphosphaat,  $\text{PO}_4$  (p). Men ziet echter, dat de verhouding varieert tusschen zeer wijde grenzen, n.l. 0,83 en 2,47. Zelfs bij één en dezelfde koe zijn deze verhoudingen verre van constant. Ze loopen bij koe 3 uiteen van 0,98 tot 1,62; bij koe 5 van 1,29 tot 1,79 en bij koe 7 van 1,14 tot 1,65.

„The only conclusion furnished by these results is that there is no evidence of chemical combination between the casein and the phosphates of milk.”

Een ander interessant punt bij hun onderzoek is het streven om na te gaan in welken vorm het onoplosbare fosphaat in de melk voorkomt, daar in de literatuur tot nu toe zoowel sprake was van mono-, di- als tribasisch fosphaat.

Hiertoe analyseerden zij de melk en het ultrafiltraat op Ca en Mg. (Tabel IV).



**TABEL IV. Amounts of Ca and Mg in insoluble portion of milk.**

Cow No.	Calcium			Magnesium		
	Total %	Soluble %	Insoluble %	Total %	Soluble %	Insoluble %
1	0,1607	0,0734	0,0873	0,0156	0,0142	0,0013
2	0,1381	0,0511	0,0870	0,0136	0,0117	0,0019
3	0,1362	0,0544	0,0818	0,0180	0,0142	0,0038
3	0,1559	0,0534	0,1025	0,0170	0,0156	0,0014
4	0,1483	0,0343	0,1140	0,0184	0,0128	0,0056
5	0,1396	0,0531	0,0865	0,0156	0,0124	0,0032
5	0,1256	0,0454	0,0802	0,0147	0,0134	0,0013
6	0,1413	0,0373	0,1040	0,0160	0,0127	0,0033
7	0,1464	0,0526	0,0938	0,0144	0,0121	0,0023
7	0,1523	0,0450	0,1673	0,0177	0,0127	0,0050
8	0,1506	0,0439	0,1062	0,0153	0,0118	0,0035
9	0,1503	0,0440	0,1063	0,0171	0,0126	0,0045
10	0,1410	0,0543	0,0867	0,0168	0,0141	0,0027
11	0,1379	0,0357	0,1022	0,0168	0,0119	0,0049
12	0,1659	0,0414	0,1245	0,0191	0,0123	0,0068
13	0,2167	0,0669	0,1498	0,0236	0,0163	0,0073

Zij gaan bij hun berekening uit van het resultaat van hun vroeger onderzoek (7), waarbij gevonden werd, dat een gram caseïne  $9 \times 10^{-4}$  gramaequivalenten calcium bindt om een zout te vormen, dat neutraal is ten opzichte van phenolphthaleïne.

Zij berekenen zoo de hoeveelheid Ca, die door de caseïne gebonden is, terwijl zij verder aannemen, dat het anorganische onoplosbare fosphaat als  $\text{CaHPO}_4$  aanwezig is. Zij krijgen zoo een sluitende balans tusschen het Ca en Mg eenerzijds en het phosphorzuur en caseïne anderzijds, waaruit zij dus de conclusie trekken, dat het fosphaat als  $\text{CaHPO}_4$  aanwezig is.

Teneinde hun bewering nog te verstevigen analyseeren de auteurs het „separator slime”, dat zij verkregen door de melk door een centrifuge te laten loopen. Zij herhalen dit tot 18 x toe en verwijderen het centrifugaat na de 1ste, 6de, 12de en 18de maal doorloopen van de melk. Zij reinigen het verkregen centrifugaat met alcohol en aether en analyseeren het na drogen in vacuo boven zwavelzuur.

**Tabel V. Composition of insoluble portion of milk.**

Sample after	Casein	Total phospho- rus z+p	Phospho- rus in casein z	Phospho- rus as phosphate p	Calcium r+s	Organic P Inorg. P z/p
1st run	86,31	2,182	0,621	1,561	3,386	1:2,51
6th run	91,98	2,023	0,662	1,361	3,223	1:2,06
12th run	90,07	1,950	0,649	1,301	3,246	1:2,00
18th run	90,84	2,011	0,645	1,366	3,343	1:2,11

Ook hier vinden zij, dezelfde constanten aannemend als bij de eerste proef, een kloppende balans, tusschen de basen en de zuren, indien het fosphaat als  $\text{CaHPO}_4$  wordt aangenomen.

**Eigen berekeningen aan de hand van de gevonden cijfers.**

Tegen deze berekeningen van Van Slyke & Bosworth moeten de volgende bezwaren worden ingebracht.

1. Zij nemen op grond van hun onderzoek (8) aan, dat het



organisch phosphor in caseïne 0.71 % is. Bij deze bepaling werd de caseïne waarschijnlijk te rigoreus „gezuiverd”, waardoor een weinig van het esterphosphaat is verloren gegaan. Van Slyke & Baker (9) kwamen later ook op het oorspronkelijke cijfer van Hammarsten (10) terug, n.l. 0,85 %.

2. De auteurs hebben het Ca-gehalte der caseïne bij het omslagpunt van phenolphthaleïne genomen, dus bij ongeveer pH 8,5, terwijl wij de casine bij pH van melk, dus bij 6,7 moeten bezien. Men zal dus inzien, dat men bij een pH van ca. 8.5 een te hoog gehalte van Ca zal moeten vinden.

Lehmann (5) vindt 10,4 mg, Söldner (4) 11 mg, Palmer & Richardson (26) 10,5 mg, Richmond (16) 10,1 en Ling (24) 10 mg Ca per gram caseïne; dit levert een gemiddelde van 10,4 mg. Ik heb hier het cijfer van De Kadt (25) gebruikt, n.l. 10,5 mg Ca per gram caseïne. Terloops merk ik hierbij op, dat deze hoeveelheid equivalent is aan het esterphosphaat van de caseïne, aangenomen, dat het P-gehalte 0,85 % bedraagt.

Wanneer wij nu het analyse-materiaal van Van Slyke & Bosworth herleiden met behulp van deze nieuwe gegevens, waarbij P als  $PO_4$  wordt aangegeven, dan krijgen wij Tabel VI en Tabel VII

**Tabel VI. Hoeveelheid in mg per 100 gram melk.**

	Tot. onoplosb. $PO_4$	Ester $PO_4$ z	Triphos. $PO_4$ p	Tot. onoplosb. Ca r+s	Cas. Ca r	Triphos. Ca s	Molec. Ca/ $PO_4$ s/p	Ester- $PO_4$ (z) Triph.- $PO_4$ (p)
1	139	87,0	51,0	87,3	36,5	50,8	—	—
2	192	68,4	123,6	87,0	28,7	58,3	1,20	1:1,81
3	158	69,5	88,5	81,8	29,2	52,6	1,42	1:1,29
3	176	104,0	72,0	102,5	42,9	59,6	1,95	1:0,69
4	218	77,3	140,7	114,0	32,4	81,6	1,39	1:1,90
5	144	72,0	72,0	86,5	30,2	56,3	1,85	1:1,00
5	164	67,5	96,5	80,2	28,3	51,9	1,28	1:1,43
6	200	73,0	127,0	104,0	30,7	73,3	1,37	1:1,74
7	158	85,0	73,0	93,8	35,7	58,1	1,88	1:0,86
7	205	89,0	116,0	107,3	37,4	69,9	1,43	1:1,31
8	186	89,5	96,5	106,2	36,6	69,6	1,71	1:0,91
9	206	86,6	119,4	106,3	31,4	74,9	1,49	1:1,38
10	149	77,5	71,5	86,7	32,6	54,1	1,79	1:0,92
11	201	84,0	117,0	102,2	35,3	66,9	1,43	1:1,39
12	237	78,5	158,5	124,5	33,0	91,5	1,38	1:2,00
13	265	124,5	120,5	149,8	52,2	97,6	1,87	1:0,97
Gemiddeld							1,56	1:1,18



De cijfers van Tabel V na herleiding geven  
Tabel VII.

	Tot. $\text{PO}_4$ z+p	Ester $\text{PO}_4$ z	Triphos. $\text{PO}_4$ p	Tot. Ca r+s	Cas. Ca r	Triph. Ca s	Mol. Ca/ $\text{PO}_4$ s/p	Ester $\text{PO}_4$ triph. $\text{PO}_4$ z/p	$\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$ per g caseïne
	mg	mg	mg	mg	mg	mg			mg
1st run	6,684	2,158	4,526	3,386	0,906	2,480	1,30	1:2,10	81
6th run	5,976	2,252	3,724	3,246	0,945	2,301	1,47	1:1,65	66
12th run	6,485	2,270	4,215	3,343	0,945	2,398	1,35	1:1,85	73
18th run	6,206	2,299	3,907	3,223	0,966	2,257	1,65	1:1,70	68
Gemiddeld							1,44	1:1,82	72

### Conclusies.

1. Uit deze cijfers zien wij, dat de mol.-verhouding van Ca tot  $\text{PO}_4$  in het calciumphosphaat in het eene geval gemiddeld 1,56 in het andere geval gemiddeld 1,44 is, terwijl de spreiding loopt van 1,95 tot 1,20.

Dit benadert dus de verhouding 1,5 zooals in  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , zoodat wij moeten concludeeren, dat het fosphaat zeer waarschijnlijk als tertiair- en niet als secundair calciumzout aanwezig is. (Het onoplosbare Mg, dat slechts in enkele mg per liter aanwezig is, is bij onze berekening verwaarloosd.)

2. De verhouding ester- $\text{PO}_4$ : triphosphaat- $\text{PO}_4$  blijft, zooals vanzelf spreekt, ook bij deze herleiding onregelmatig, zoodat de stelling van de auteurs blijft gehandhaafd, dat er geen chemische binding zou bestaan.

Men mag tenminste niet veronderstellen, dat van Slyke & Bosworth melk zouden hebben gebruikt van verschillende zuurtegraad, waardoor én fosphaat én calcium min of meer van het complex zouden kunnen zijn afgesplitst, terwijl het esterphosphaat constant zou zijn gebleven.

3. De hoeveelheid gebonden  $\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$  per gram caseïne schommelt iets en bedraagt gemiddeld 72 mg.

Het lijkt er op, dat met het eerste centrifugaat meer  $\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$  wordt uitgeslingerd dan met de latere. Op deze kwestie komen wij later bij de bespreking der cijfers van De Kadt (25) terug.

György (11) komt tot de conclusie, dat er in de melk een complexe dubbelverbinding van calciumphosphaat en caseïne moet bestaan en wel op de volgende gronden.

Met zijn ultrafiltratieproeven met melk constateert hij, dat een groot deel van het calcium en de phosphaten der melk zich in een niet diffundeerbare vorm bevinden. Bij verhooging van de aciditeit der melk nemen deze niet diffundeerbare Ca en P af en bij het I.E.P. der caseïne zijn alle Ca en  $\text{PO}_4$  in diffundeerbare vorm overgegaan. Het feit, dat verhooging van de zuurtegraad tot een afsplitsing van Ca en anorganisch P voert, zou men als een eenvoudige verklaring der door de caseïne in suspensie gehouden calciumphosphaten kunnen aanmerken. Wanneer het zou gelukken deze omzetting van niet- in wel-diffundeerbare Ca en P bij gelijkblijvende pH te doen plaats vinden, zou men een sterk argument tegen het in suspensie houden van  $\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$  hebben.



György wil dit bereiken door bij constante pH pancreas op de melkeiwitten te laten inwerken; tegelijkertijd wordt de melk tegen water gedialyseerd. Na verloop van 48 uur worden de gehalten aan Ca en P bepaald, zoowel in de binnen als buitenvloeistof. In de binnenvloeistof worden het Ca en  $\text{PO}_4$  bepaald na verwijdering van de melkeiwitten door neerslaan met trichloorazijnzuur. Het ester-P wordt dus niet meebepaald. De analytische resultaten drukt György uit in mg per 100 gram. Van de 5 melken, die hij zoo behandelde, laat ik hier eenige analyses volgen.

I.	Nach der Dialyse				
	In der Auszenflüssigkeit			In der Innenflüssigkeit	
	Ca	P	pH	Ca	P
a)	38,6	26,0	6,5	45,0	28,0
b)	32,2	22,0	6,6	45,0	32,0

a) 20 ml taptemelk + 5 ml pancreas-oplossing: gedialyseerd tegen 20 ml water.

b) 20 ml taptemelk + 5 ml water: gedialyseerd tegen 20 ml water.

II.	Buitenvloeistof			Binnenvloeistof	
	Ca	P	pH	Ca	P
a)	22,6	21,0	6,6	73,4	27,0
b)	16,2	16,0	6,6	91,2	34,0

III.

a)	19,0	17,0	6,6	44,5	23,0
b)	11,4	11,0	6,7	81,0	31,0

„Tryptische Verdauung der Milch führt bei unveränderter H-Ionenkonzentration zu einer Erhöhung des diffusiblen Kalk- und Phosphatanteils.“

Het calciumphosphaat is dus volgens György aan de caseïne gebonden door een dubbelverbinding.

#### Critische beschouwing.

1. György dialyseert 25 cm<sup>3</sup> verdunde melk tegen 20 cm<sup>3</sup> water door perkamenthulzen van Schleicher en Schüll. Na 48 uur zal in dit geval de dialyse nog niet voltooid zijn, dus het evenwicht nog lang niet ingetreden.

2. Hij drukt de resultaten uit in mg procenten, doch vermeldt niets over volume-veranderingen, die noodzakelijkerwijs in de twee systemen moeten optreden.

György trekt echter uit de additie der hoeveelheden P in binnen- en buitenvloeistof de conclusie, dat geen organisch (ester) P wordt vrijgemaakt, daar er geen absolute vermeerdering plaats vindt in het P-gehalte.

Wij zouden hieruit moeten opmaken, dat de volumina na de dialyse gelijk zouden zijn.

Addeeren wij echter in de genoemde 3 gevallen de percentages Ca van binnen- en buitenvloeistof en eveneens die van P, dan moeten wij met of zonder pancreas dezelfde bedragen voor Ca en idem voor P vinden:

I.	Som Ca		Som P
	a)	b)	
	83,6	90,2	54
			54

II.	Som Ca		Som P
	a)	b)	
	96,0	107,4	48
			40



### III.

a)	63,5	40
b)	92,4	42

De som voor P klopt ongeveer, doch voor Ca totaal niet.

3. Bij de dialyse van melk tegen water treedt een Donnan-evenwicht op. Wanneer wij de eiwitten met pancreas gaan afbreken, komen er door verbreking der peptidebindingen nieuwe actieve groepen vrij. Er zal zich dus een ander Donnan-evenwicht moeten instellen.

Ik zou hieruit dus willen concludeeren, dat uit de gegevens, zooals György die mededeelt, geen conclusie mag worden getrokken over de vermeerdering van de diffundeerbare Ca en P.

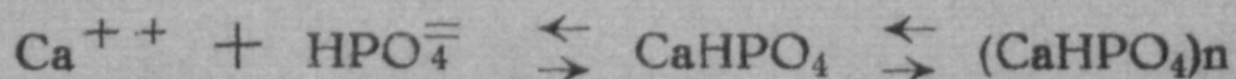
Wright (12) grondt zijn meening, dat het onoplosbaar fosphaat in melk als  $\text{CaHPO}_4$  aanwezig is, op de volgende theoretische redeneeringen.

Indien een oplossing van  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  aan een oplossing van  $\text{CaCl}_2$  wordt toegevoegd, wordt  $\text{CaHPO}_4$  gevormd als een onoplosbaar vlokkelig precipitaat.

Wordt echter  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  gemengd met een calciumcaseïnaat-oplossing of een natriumcaseïnaatoplossing, waaraan tevoren  $\text{CaCl}_2$  is toegevoegd, dan slaat er geen  $\text{CaHPO}_4$  neer, doch wordt het zout in betrekkelijk stabiele colloïdale oplossing gehouden. Wright gaat verder de evenwichten na, die zich bij dialyse door middel van een cellophaanmembraan instellen, van water tegen een natriumcaseïnaatoplossing, waaraan  $\text{CaCl}_2$  of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  of deze beide laatste zouten zijn toegevoegd.

Uit de verhoudingen van het Ca en fosphaat in binnen- en buitenvloeistof concludeert Wright, dat het calcium bij aanwezigheid van het fosphaat zeer sterk wordt vastgehouden en tevens dat er een sterke fosphaatretentie is.

Door de hoeveelheid oplosbaar fosphaat in het systeem te verminderen, wordt er minder calcium vastgehouden; vermeerdering van het fosphaat gaat gepaard met grotere retentie. Dit resultaat mag volgens Wright worden verwacht wanneer men de omkeerbare reactie beschouwt.



#### Critische beschouwing.

Wright neemt zonder meer aan, dat bij samenvoeging van  $\text{CaCl}_2$  en  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{CaHPO}_4$  en  $\text{NaCl}$  zal ontstaan zonder dat hij de pH van het mengsel vermeldt.

Holt, La Mer en Chown (13) komen in een publicatie over beenderverkalking tot andere conclusies.

Zij titreerden phosphorzuur met  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , waarbij de oplosbaarheidsevenwichten zich eerst na 10 dagen heftig schudden hadden ingesteld. Volgens hun cijfers is er bij  $38^\circ \text{C}$  ten opzichte van de pH een overgangspunt van  $\text{CaHPO}_4$  in  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , zoodat in zure oplossing (pH5) het zure zout neerslaat, bij hogere pH het neutrale zout.

Porcher (2) was van opinie, dat het onoplosbare calcium-fosphaat noch geheel secundair, noch geheel tertiair was, doch een mengsel van deze twee. Hij baseerde deze meening op zijn proeven met zijn kunstmatige calciumcaseïnaatcalcium-fosphaatcomplexen. Deze complexen worden gemaakt door toevoeging van voldoende phosphorzuur aan een sterk alkalische calciumcaseïnaatoplossing tot een pH van ongeveer 7 is bereikt.

Porcher neemt aan, dat het calcium, dat eigenlijk bij het caseïnaat behoort in het complex, gelijk is aan het gehalte aan



calcium, dat bij zuiver calciumcaseïnaat van dezelfde pH wordt gevonden. Op deze wijze vond Porcher, dat 1 grammol  $\text{H}_3\text{PO}_4$  noodig was om 1,25 grammol.  $\text{CaO}$ , die als overmaat aanwezig was, te neutraliseeren.

Dit resultaat correspondeert dus met de vorming van  $\text{CaHPO}_4$  en  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in gelijke hoeveelheden (de mol. verhouding in  $\text{CaHPO}_4 = 1$  en in  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 = 1,5$ ).

Over den aard van de band tusschen het colloïdale fosphaat en de caseïne laat Porcher zich niet uit.

#### Critische beschouwing:

Hoewel Porcher zelf erkent, dat bij de bereiding van zijn complexen door de neutralisatie met phosphorzuur geringe hoeveelheden monocalciumphosphaat worden gevormd, en dat dicalciumphosphaat zelf iets oplosbaar is bij de pH der complexen, heeft hij de draagwijdte van deze feiten bij zijn berekeningen blijkbaar over het hoofd gezien. Toch spreekt het vanzelf, dat zij grooten invloed zullen hebben op de interpretatie der resultaten van de titratie. Immers, het monocalciumphosphaat, waarin de mol.-verhouding  $\text{Ca}/\text{PO}_4 = 0,5$ , behoeft slechts in geringe mate aanwezig te zijn om de verhouding 1,5 van tricalciumphosphaat sterk te doen dalen.

De door Porcher gevonden verhouding 1,25 zal dus wel gelden voor de som der door het calciumcaseïnaat gebonden colloïdale fosphaat en het opgeloste calciumphosphaat, doch voor het gebonden fosphaat zal deze verhouding meer dan 1,25 moeten bedragen.

Pyne (14) ultrafiltreert 2 van zulke calciumcaseïnaat-calciumphosphaat-complexen en analyseert deze. Hij vindt de mol.-verhoudingen  $\text{Ca}/\text{PO}_4$  in het colloïdale fosphaat 1,39 en 1,41, dus aanmerkelijk dichter bij de verhouding, zooals die in het tertiaire zout voorkomt. Wij moeten hieruit dus concludeeren, dat ook in het complex het calciumphosphaat grootendeels, zoo niet geheel, als tertiair zout aanwezig zal zijn.

Pyne (14) komt door een onderzoek, dat hij instelde over de melkeiwitten-bepaling door de formaldehydetitratie min of meer toevallig tot de conceptie, dat het colloïdale-calciumphosphaat als triphosphaat in melk aanwezig is en dat de band van chemischen aard is. Deze methode werd oorspronkelijk voorgesteld door Steineggar (15), waarbij getitreerd werd met  $\text{NaOH}$ .

Richmond (16) beval aan met  $\text{Sr}(\text{OH})_2$  te titreeren, daar hiermede scherper kon worden getitreerd. Hij merkte echter tevens op, dat men hiermede hogere titratiewaarden verkreeg. Hetzelfde werd geconstateerd door Roeder & Radoi (17) bij titraties met  $\text{NaOH}$  en  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

Het verschil moet, behalve aan het verschil in hydrolyse der alkali- en aardalkalizouten der melkproteïnen, voornamelijk worden toegeschreven aan de verschillende mate, waarin het fosphaat in deze twee gevallen wordt geprecipiteerd.

Dit nu doet zich ook gevoelen bij de formoltitraties. In verband met het feit, dat de eiwit-titratie vlgs Sørensen in connectie met dit onderwerp ook bij vele anderen herhaaldelijk is gebruikt en nog gebruikt wordt, zou ik de aandacht willen vestigen op de werkelijke aard van deze titratie, temeer, daar het uit de literatuur vaak blijkt, dat het inzicht hieromtrent vaag en veelal niet juist is.

In de eerste plaats heerscht algemeen de opvatting, dat door toevoeging van formale de aminogroepen hun basiciteit verloren verliezen. Dit is nu allerm minst waar. De basische eigenschappen worden wel verzwakt, maar niet vernietigd, en het



verschil komt tot uiting in de dissociatieconstante van de betreffende groep, die gemiddeld ongeveer 1000 maal kleiner wordt. De pK neemt dus 3 eenheden af. Bijzonderheden hierover zijn te vinden in een groot aantal publicaties van L. J. Harris, die deze dissociatieconstanten bepaald heeft.

Een tweede misverstand is belichaamd in de opvatting, dat men met behulp van de titratie volgens Sørensen „de” vrije aminozuren van een eiwit zou bepalen. Dat dit niet juist is, valt af te leiden uit hetgeen wij onder ons eerste bezwaar opmerkten. Om dit in te zien maken wij allereerst de inventaris op van de groepen, zooals die, voor zoover bekend, b.v. bij caseïne voorkomen.

Dit zijn:

#### **Alpha-aminogroepen.**

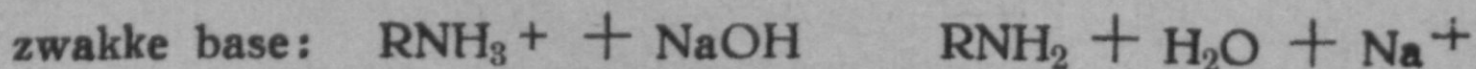
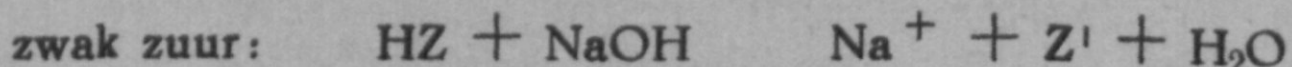
Deze komen in elk aminozuur voor. Hun schijnbare pK ligt bij ongeveer 9. Hun aantal is natuurlijk zeer groot, doch ze zijn praktisch allemaal opgeborgen in een peptide binding, waarvan wij de basische of zure eigenschappen niet kennen, maar waarvan wij weten, dat zij zeer zwak zijn en in het meetbare pH-gebied zullen wij in elk geval geen rekening met deze groepen behoeven te houden. Resteeren dus, een waarschijnlijk gering aantal eindstandige groepen, aan het eind der polypeptideketens.

#### **Vrije aminogroepen.**

Hieronder vallen:

1. De  $\text{NH}_2$ -groepen, die zich bevinden aan de niet in de keten opgenomen  $\text{COOH}$ -groep der dicarbon-aminozuren. De dissociatieconstante van deze zuren is niet bekend, maar de schijnbare pK van deze aminozuren is klein, in elk geval beneden 4 en vermoedelijk nog veel lager.
2. De  $\text{NH}_2$ -groep uit de guanidinegroep van arginine. Deze groep is sterk basisch. De waarde van pK varieert in de literatuur van 12 tot 14. Dat beteekent, dat wij al nauwelijks meer van een constante kunnen spreken.
3. De vrije  $\text{NH}_2$ -groep van lysine met een pK van 10,5.
4. De vrije  $\text{NH}$ -groep van histidine met een schijnbare pK van 6,1.

Ofschoon dus het aantal  $\text{NH}_2$ -groepen in een eiwit zeer groot is, is het aantal dat hun basische invloed naar buiten kan uitoefenen, blijkens het bovenstaande, vrij beperkt. Maar ten opzichte van de bepaling volgens Sørensen gelden nog verdere beperkingen. Wanneer wij de eiwitoplossingen titreeren, dan zullen wij over een bepaald pH-traject een verbruik vinden, wanneer er een groep óf gedissocieerd wordt óf uit de gedissocieerde toestand in de niet geïoniseerde toestand wordt omgezet. Titreert men met een base, dan kunnen wij dit voorstellen door de reacties:



Praktisch kunnen wij zeggen, dat voor een bepaalde groep het verbruik valt in een pH-traject van 3 eenheden, ter weerszijden van die pH, die numeriek gelijk is aan:

de ware dissociatieconstante als een groep een zuur is;

de schijnbare dissociatieconstante als de groep een base is.

Zonder meer weten wij nooit of wij een zuur dan wel een base titreeren.

Het feit, dat ons echter voornamelijk interesseert is dit, dat



elke groep slechts in een zeer bepaald pH-traject kan reageeren. Passen wij dit nu toe op de titratie volgens Sørensen dan kunnen wij de resterende  $\text{NH}_2$ -groepen nog weer eens indeelen als volgt.

1. Groepen, die zoo zwak zijn, dat reeds zonder toevoeging van formaline hun omzetting zich beneden de omslag-pH van phenolphtaleïn afspeelt.
2. Groepen, die zoo sterk zijn, dat zelfs na toevoeging van formaline bij de omslag-pH van phenolphtaleïn geen omzetting plaats vindt.
3. Groepen, welker sterkte van dien aard is, dat zonder formaline het omzettingstraject boven het omslagpunt is, terwijl na de toevoeging van formaline de base zoodanig verzwakt is, dat nu het omzettingstraject valt vóór het omslagpunt.

Het is nu duidelijk, dat slechts de groepen onder 3 de oorzaak kunnen zijn van het verschil in verbruik, zooals dat bij de titratie volgens Sørensen gevonden wordt. Gaan wij nu verder na onder welke klasse de nog resterende groepen thuishooren, dan vinden wij:

zwakke basen: de zuuramidegroepen en histidine, pK 6 of minder.

sterke basen: arginine, pK 14 vóór de formalinetoevoeging en zeker niet onder 11 na deze toevoeging. Bij een titratie-pH van 9 komt deze groep dus niet aan bod.

Sørensen-base: lysine, met een pK vóór de toevoeging van 10,5, terwijl de pK van de betreffende formaline-lysine verbinding op ongeveer 7,5 gesteld kan worden.

Met andere woorden:

De titratie volgens Sørensen bepaalt niet „de” aminogroepen in het eiwit, maar met deze titratie bepalen wij uitsluitend het aantal aanwezige lysinegroepen in het eiwit.

De titratie volgens Sørensen is dus in wezen een lysinebepaling. Er is dus geen sprake van, dat men het zuur titreert, dat is vrijgekomen door de inwerking van formaline. Het geval wil juist, dat wij een basische groep titreeren. Wij gaan hier niet verder op de nauwkeurigheid van deze titratie als lysinebepaling in.

Pyne toont aan, door de formoltitratie toe te passen op eiwitten met en zonder toevoeging van opgeloste phosphaten, dat met phosphaten steeds een iets hogere waarde voor de formaldehydetitraties wordt verkregen.

Reeds door Van Slyke & Bosworth (8) was aangeraden om bij de titraties van melk deze fosphaatprecipitatie, door neutraal kaliumoxalaat (2% van een verzadigde oplossing) toe te voegen, uit te schakelen.

Pyne past dit nu toe op de formoltitratie:

Material	Formaldehyde value		alkali
	cm <sup>3</sup> N alkali per 100 cm <sup>3</sup> milk		
	A	B	
milk alone	1,69	1,71	NaOH
milk + 2% oxalate	1,80	1,92	NaOH
milk alone	1,94	2,01	Sr(OH) <sub>2</sub>



Men zou verwachten, dat de oxalaatwaarde de laagste der drie zou zijn. Pyne toont echter aan, door de oxalaatformoltitratie met NaOH en  $\text{Sr}(\text{OH})_2$  op zuivere eiwitten toe te passen, dat dit moet worden gezocht in verschillende hydrolyse der zouten van het proteïne en wel speciaal van het formaldehyde-proteïne. Hij vond zoo, dat de formaldehyde-waarde bij titratie met NaOH ongeveer 3,5% lager lag dan die in tegenwoordigheid van oxalaat.

Paste hij deze methode toe op melk, dan vond hij echter, dat de titratie met oxalaat een formaldehydewaarde opleverde, die 9—13% hooger lag.

Dat nu de formaldehyde-oxalaattitraties van melk gemiddeld 11 % hooger liggen dan de formaldehyde-titraties zonder oxalaat, verklaart Pyne door te veronderstellen, dat het colloïdale fosphaat hier een rol mee gaat spelen. Hij gaat dit na aan caseïnaat-fosphaatcomplexen, bereid volgens Porcher (2) en vindt ook hier een duidelijke verschuiving in de formaldehydewaarde door oxalaattoevoeging in dien zin, dat met oxalaat de waarde ongeveer 16% hooger wordt gevonden.

Het feit, dat de aciditeit, ontstaan door formaldehyde aan een oplossing van calciumcaseïnaat toe te voegen, merkbaar kleiner wordt bij aanwezigheid van colloïdaal calciumfosphaat, kan Pyne niet anders verklaren dan door aan te nemen, dat het caseïnaat en fosphaat niet als afzonderlijke bestanddeelen in melk aanwezig zijn, maar met elkaar in een of andere chemische binding staan.

In een latere publicatie gaat Pyne (18) ook andere complexen, zooals het caseïnaat-carbonaat-complex (bereid volgens Porcher) en gelatinecalciumfosphaatcomplex na op deze oxalaattitraties. De gelatinefosphaatcomplexen werden bereid volgens De Toni (19).

Solution	% total protein	Formaldehyde value ml alkali per 100 ml solution	
		with oxalate	without ox.
Caseïnogen-calc. phosphat. complex	2,3	1,30	1,15
Caseïnogen-calc. carb. „	2,0	1,14	0,98
Gelatin-calc. phosphate „ A	4,5	1,39	1,37
Gelatin-calc. phosphate „ B	0,0	1,32	1,31
Gelatin-calc. phosphate „ C			
+ calc. caseinogenate (2,5 %)	4,75	2,05	2,07

Hieruit wordt dus duidelijk, dat de protectie van het calciumfosphaat (en carbonaat) geheel verschillend moet zijn van de protectie van andere eiwitten, zooals hier gelatine.

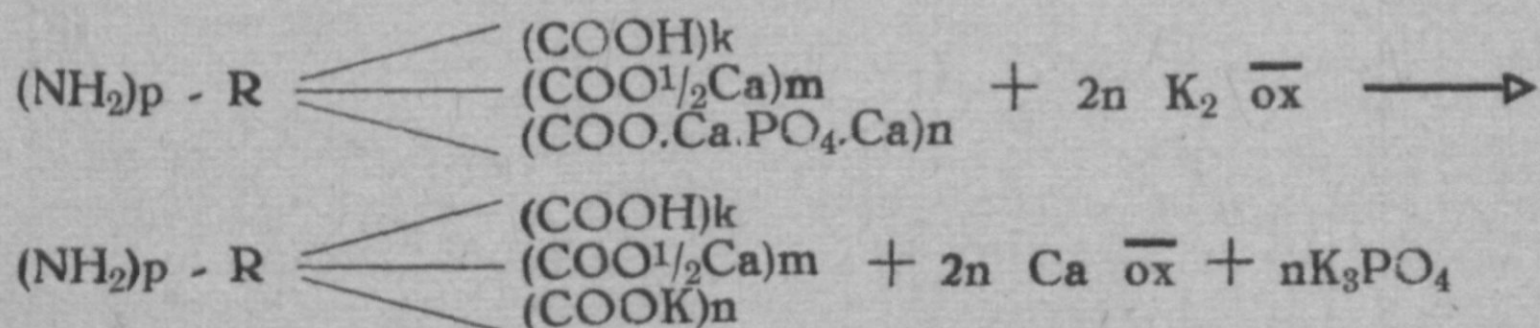
Daar het colloïdale fosphaat door de gelatine als beschermend colloïd in suspensie wordt gehouden, aldus Pyne, zal bij de caseïne het calciumfosphaat meer chemisch gebonden zijn.

Steun voor deze veronderstelling vindt hij in het reeds eerder besproken onderzoek van György (11) en door het onderzoek van Kometiani (20) over verhitte melk.

Kometiani schreef van de door verhitting van melk ontstaande aciditeitsverhooging althans een gedeelte toe aan de afscheiding van calcium van de carboxylgroepen in het calciumcaseïnaat-complex. In overeenstemming hiermede vindt Kometiani een verhoogde formaldehydetitratie bij verhitting der melk (15% bij verhitting van een half uur op 120° C.).



Het snelle losmaken door de actie van het oxalaat doet Pyne veronderstellen, dat de gemeenschappelijke band tusschen het fosphaat en caseïnaat een of meer calciumatomen zijn en dat het complex dus een dubbelzout van caseïnaat en fosphaat is. De duidelijke verschuiving naar de alkalische zijde door de toevoeging van kaliumoxalaat maakt het waarschijnlijk, dat al het fosphaat van het tertiaire calciumzout vrijkomt als  $K_3PO_4$ . Schematisch stelt Pyne het aldus voor:



**De vorm, waarin het colloïdale calciumfosphaat in melk voorkomt.**

1. Pyne & Ryan (21) toonden aan, bij toevoeging van 4 % eener verzadigde kaliumoxalaatoplossing aan melk, dat de zuurtegraad gemiddeld 1,20 cm<sup>3</sup> N terugliep per 100 cm<sup>3</sup> melk, getitreerd tegen phenolphtaleïn.

Bij wei, die op gelijke wijze met oxalaat werd behandeld, was de teruggang in aciditeit ongeveer 0,30 cm<sup>3</sup> N per 100 cm<sup>3</sup>. De netto alkaliteit, die dus ontwikkeld wordt door de wisselwerking van het oxalaat met het caseïnaatcalciumfosphaat-complex der melk, bedraagt dus 0,90 cm<sup>3</sup> N.

De bron dezer alkaliteit is het  $K_3PO_4$ , dat volgens bovenstaande reactie zou ontstaan. Het fosphaat moet dus wel als het tertiaire calciumzout aanwezig zijn:

- oplossingen van calciumcaseïnaat alleen ontwikkelen slechts zeer geringe alkaliteit bij toevoeging van oxalaat.
- indien dicalciumfosphaat in het complex aanwezig zou zijn, zou dit overgaan in dikaliumfosphaat ( $K_2HPO_4$ ) en dit reageert neutraal ten opzichte van phenolphtaleïn, waartegen getitreerd wordt.

Als men dus aanneemt dat 0,90 cm<sup>3</sup> N de hoeveelheid zuur voorstelt, die noodig is om het tricalciumfosphaat van 100 cm<sup>3</sup> melk via  $K_3PO_4$  om te zetten in  $K_2HPO_4$ , dan kan het gehalte aan  $Ca_3(PO_4)_2$  der melk worden berekend en men vindt dan 0,14 g per 100 cm<sup>3</sup> melk, welke dus 0,076 g CaO bevat.

Daar Söldner (4) het calcium van het fosphaat berekende en 0,071 g/100 cm<sup>3</sup> vond en Porcher & Chevalier (22) ongeveer 0,065 g/100 cm<sup>3</sup> vonden, wil dit dus zeggen, wegens het geringe verschil dezer waarden, dat zeer veel, zoo niet alle colloïdale fosphaat tertiair is.

- Pyne (18) toonde dit ook nog aan door het gehalte aan tricalciumfosphaat, verkregen door oxalaattitratie der melk en wei, te vergelijken met het totale colloïdale fosphaat, verkregen door het verschil tusschen het totale in zuur oplosbare anorganische fosphaat van melk en wei. Hij vond zoo een goede overeenstemming.

Sample	ml N/10 per 100 ml milk	Net oxalate shift	Insoluble inorganic P as ml N/10 $H_3PO_4$ /100 ml
A		8,5	8,3
B		8,5	9,0
C		11,9	13,0



3. Bij toevoeging van een m/5  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -oplossing met een pH 8,47 aan een calciumcaseïnaatoplossing met dezelfde pH, neemt Pyne een daling der pH van het mengsel waar. Zoo er dicalciumphosfaat werd gevormd door de reactie tusschen de beide oplossingen, zou de pH van het geheel niet moeten veranderen t.o.v. de pH der constituenten. Wordt echter tricalciumphosfaat gevormd, uit de elementen van  $\text{CaHPO}_4$ , dan moet de oplossing zuurder worden, waarmede de waarnemingen dus in overeenstemming zijn.
4. Potentiometrische titratiecurven van gedialyseerde oplossingen van een calciumcaseïnaat en een calciumcaseïnaat-phosfaatcomplex met dezelfde pH, verliepen niet geheel en al identiek tusschen pH 7 en 10, waarbij  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  niet buffert. Tusschen pH 7 en 8,5 trad een wat sterkere buffering bij het complex op, hetgeen een aanwijzing zou zijn voor het optreden van een chemische band.

#### Critische beschouwing.

Dat het colloïdale fosphaat een rol speelt bij de formaldehyde-oxalaattitratie is uit deze onderzoeken wel duidelijk. Zij worden echter verkeerd uitgelegd, doordat hier weer sprake is van een niet goed interpreteren der titratie. Pyne heeft zich niet gerealiseerd, dat de formoltitratie met of zonder oxalaat in beide gevallen neerkomt op een min of meer nauwkeurige bepaling der vrije epsilon-aminogroepen der lysine.

Door de toevoeging van oxalaat, waardoor dus het colloïdale fosphaat van het complex wordt verwijderd, vindt hij een verhoogde formoltitratie. Dit kan niet anders worden verklaard dan door aan te nemen dat dit fosphaat op een of andere wijze in het complex de lysinegroepen heeft geblokkeerd.

Bij zijn schema voor de dubbelverbinding wordt het fosphaat aan de carboxylgroepen gekoppeld. Hij wordt hiertoe gebracht door de onderzoeken van Kometiani over verhitte melk. Na verhitting van melk vindt Kometiani een duidelijk verhoogde formoltitratie, welke hij verklaart door het vrijkomen van carboxylgroepen, doordat onder invloed der warmte hiervan Ca wordt afgesplitst.

Het is nu echter duidelijk, dat Kometiani met zijn verhoogde formoltitratie bij verhitte melk alleen meer lysinegroepen kan hebben getitreerd. Kometiani verhit melk 30 minuten op verschillende temperaturen en bepaalt de formaldehydewaarde en de aminogroepen.

Temperatuur	rauwe melk	100°C	110°C	120°C
Formoltitratie in 1/10n NaOH	21,3	21,6	23,5	28,2
Aminogroepen in mg N	2,43	2,40	2,48	2,45

Uit het gelijkblijven der aminogroepen concludeert hij terecht, dat de vermeederde titratie niet door een splitsing der polypeptidebinding kan zijn veroorzaakt, waarna hij dan abusievelijk besluit, dat de vrije carboxylgroepen worden getitreerd nadat hiervan Ca is afgesplitst.

Wanneer wij echter bij de oxalaatformoltitratie zoowel als bij de titratie volgens Sørensen na verhitting een vermeederding constateeren, worden in beide gevallen lysinegroepen vrijgemaakt.

Dat Kometiani gelijkblijvende hoeveelheden aminostikstof vindt, wordt verklaard door het feit, dat deze bepaling in zuur milieu plaats vindt, waarbij alle anorganisch calciumphosfaat van de caseïne is afgesplitst.

Ik moet dus uit deze proeven de gevolgtrekking maken, dat het fosphaat op een of andere wijze met de epsilon-aminogroep van lysine is verbonden, waardoor de voorstelling van Pyne niet juist kan zijn.

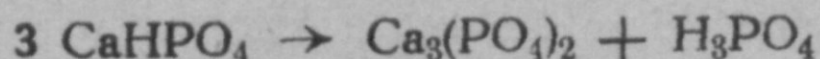


Ling (23,24) werkte de methode van onderzoek van Pyne verder uit en daar ik bij mijn onderzoek deze werkwijze toepaste, wil ik deze hier bespreken.

Ling beschouwt de gewone titratiewaarde van melk ( $M_1$ ) als de som van drie factoren, n.l.:

- de caseïne-zuurtegraad (c)
- de ware serum-aciditeit (s)  $M_1 = c + s + o$
- de „overrun” (o)

Deze overrun (o) ontstaat tijdens de titratie, doordat opgelost  $\text{CaHPO}_4$  wordt omgezet in  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  en  $\text{H}_3\text{PO}_4$  volgens:



Door het toevoegen van genoeg oxalaat wordt deze overrun nu geëlimineerd, maar, naar blijkt uit het onderzoek van Pyne (14), wordt een nieuwe factor geïntroduceerd, n.l. de alkaliteit (X) van het colloïdale triphosfaat.

De titratiewaarde na toevoeging van 4 % verzadigd oxalaat wordt dan:

$$M_2 = (c+s) - X$$

Bij lebwei, die beschouwd wordt als melk zonder de caseïnaat-phosfaatphase, hebben wij dus de titratiewaarden:

$$W_1 \text{ (zonder oxalaat)} = s+o \text{ en } W_2 \text{ (met oxalaat)} = s.$$

Aannemende, dat de waarden (c) en (s) door het oxalaat niet worden aangetast, geldt dan:

$$(M_1 - M_2) - (W_1 - W_2) = X.$$

Gebruikmakend van de betrekking  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \equiv 2\text{K}_3\text{PO}_4 \equiv 2$  liter N zuur, kan de waarde X omgezet worden in grammen  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

a. Bij zijn bepalingen van de gehaltes aan opgelost  $\text{PO}_4$  en Ca in de continue phase bij verschillende zuurtegraden der melk, vindt Ling, dat de vermeerdering van  $\text{PO}_4$  hierin geheel klopt met het berekende  $\text{PO}_4$ , dat afgesplitst is in de vorm van triphosfaat, bepaald volgens de titratiemethode.

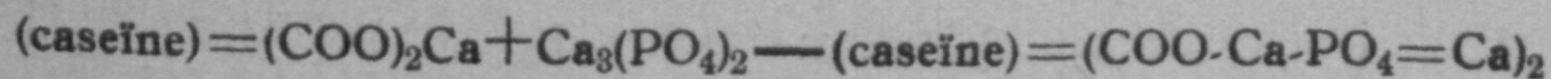
Bij Ca, op dezelfde wijze bepaald, vindt hij echter, dat meer wordt afgesplitst bij het zuur worden der melk, dan teruggevonden wordt in het afgesplitste calciumtriphosfaat. Dit komt door de afsplitsing van caseïnecalcium.

Door van de totale vermeerdering aan Ca in de wei het Ca af te trekken, dat er door het afgesplitste triphosfaat is bijgekomen, vindt Ling het afgesplitste Ca der caseïne. Hieruit blijkt, dat het caseïnecalcium later en moeilijker afsplitst dan het tricalciumphosfaat bij het zuur worden der melk. Bij het zuur worden van melk gaat dus eerst het calciumtriphosfaat (s+p) in oplossing, later volgt ook het caseïnecalcium (r).

Indien het fosfaat door het caseïnecalcium aan de caseïne is gehecht, zooals Pyne (14,18) dit wil voorstellen, dan is het voorgaande toch wel zeer moeilijk te verklaren, terwijl, wanneer men een meer afzonderlijk bestaan van het colloïdale fosfaat aanneemt, dit verschil in oplosbaarheid zou kunnen worden verwacht.

b. Een groot aantal monsters gemengde melk van 48 Dairy Shorthorns werden in de loop van een jaar geanalyseerd.

Ling berekent hieruit o. a. de hoeveelheden  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  en caseïnecalcium per gram caseïne, welke hoeveelheden in de loop van het jaar aan schommelingen onderhevig blijken te zijn. De verhouding van het calcium als triphosfaat (s) tot het caseïnecalcium (r) is nu van speciaal belang met het oog op de theorie van Pyne, dat het colloïdale fosfaat aan de caseïne zou zijn gebonden met caseïnecalcium als medium:





Indien het fosphaat aldus chemisch aan de caseïne zou zijn gebonden, zou men verwachten, dat de verhouding zou zijn als 3:1. In ieder geval zou men geen groote afwijkingen hiervan verwachten.

Uit zijn cijfermateriaal blijkt, dat de gemiddelde verhouding 2,28 is, met als uitersten 1,5 en 6,3.

In 10 % der gevallen was de verhouding groter dan 3:1. Wanneer men verder aanneemt, dat bij een scherpe val in het voorjaar van het totale gehalte aan calcium, dit effect meer tot uiting komt in het caseïne calcium (r) dan in het triphosphaat calcium (s), dan blijkt hieruit, dat de vorming van tricalciumphosfaat eerder plaats vindt dan de verzadiging van de caseïne met calcium.

Het is moeilijk deze feiten te verklaren door aan te nemen, dat er een chemische band tusschen het  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  en de caseïne zou bestaan.

c. Wanneer men de caseïne-zuurtegraad ( $M_1 - W_1$ ) en de hoeveelheid triphosphaat calcium, beide per gram caseïne uitgedrukt, grafisch tegen elkander uitzet, blijkt er een vrijwel lineaire betrekking tusschen deze beide grootheden te bestaan.

Bij de associatie die tusschen het colloïdale  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  en de caseïne bestaat, is de beslissende factor niet alleen de hoeveelheid caseïne, doch ook haar zuurtegraad.

Ling constateert verder, dat de basiciteit van het triphosfaat nagenoeg equivalent is met de zuurtegraad van de caseïne. Hij komt dan ook tot de volgende conclusie: „These results favour the existence of a physical association between the two colloids rather than direct chemical union; for it is difficult to conceive an acid caseinogen combining with a basic colloid in such a way as to leave the acidity unreduced”.

Eilers (58) merkt op, dat deze associatie blijkbaar wel opgaat bij vergelijking van verschillende verse monsters melk, doch dat dit niet het geval is bij verandering van zuurtegraad in één monster melk.

Zijn cijfermateriaal laat zien, dat indien aan ondermelk stijgende hoeveelheden melkzuur worden toegevoegd, een geleidelijke verandering in de waarden voor de grootheden s, c, o en X plaats vindt en dat de hoeveelheid  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in de caseïne-fractie met toenemende zuurtegraad lineair met de zuurtegraad afneemt.

„Voor de verklaring van de waarneming van Ling zal men dus moeten nagaan, welke de omstandigheden zijn, waaronder de caseïnaatphosfaat-phase in de melkklier gevormd wordt, een proces, waarover weinig met zekerheid bekend is”.

De Kadt & van Minnen (25) onderwierpen de melk aan centrifugeering door middel van een Sharples-supercentrifuge, waardoor de caseïne phase grootendeels uit de melk wordt afgescheiden.

Door analyse van het sediment en de bijbehorende wei berekenden zij het gehalte aan Ca en  $\text{PO}_4$ , dat met de caseïne werd uitgeslingerd. Voor hun berekeningen namen zij aan, dat de calcium aan de caseïne gebonden is aan het veresterd fosfaat in een hiermede equivalente hoeveelheid.

De moleculaire verhouding van de resteerende Ca en  $\text{PO}_4$  was gemiddeld 1,53 met als uitersten 1,78 en 1,38, waaruit zij de conclusie trekken, dat het calciumphosfaat als het tertiaire zout aanwezig is. Zij laten de vraag of de band een chemische of een meer physische is, onbeantwoord, zoodat twee mogelijkheden worden geoperd:

1. als een complex: caseïne —  $\text{PO}_4 = \text{Ca} \dots \dots \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
2. als een dubbelverbinding: caseïne —  $\text{PO}_4 \left\{ \begin{array}{l} \text{Ca} — \text{PO}_4 = \text{Ca} \\ \text{Ca} — \text{PO}_4 = \text{Ca} \end{array} \right.$



Aan de hand van hun cijfers berekende ik de verhouding triphosfaat- $\text{PO}_4(\text{p})$  : ester- $\text{PO}_4(\text{z})$  per gram caseïne, welke volgens bovenstaande formule theoretisch 2:1 moet zijn.

Bij Van Slyke & Bosworth (8) schommelde deze verhouding tusschen 0,69 en 2,00 met een gemiddelde van 1,18. Tabel VI). De door mij berekende verhouding leverde als gemiddelde 1,42 met een maximum van 1,65 en een minimum van 1,24. De schommelingen zijn dus veel kleiner dan bij Van Slyke & Bosworth.

Wanneer elke ester-phosphaatgroep één molecuul  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  bevatte, zou per gram caseïne aanwezig moeten zijn  $(310:95) \times 25 = 81,5$  mg triphosfaat. ,

Uit de cijfers van Ling (24) vindt men hiervoor een gemiddelde van 58,4 mg en uit die van De Kadt 57,5 mg.

De herleidde cijfers van Van Slyke & Bosworth (8) gaven een gemiddelde van 72 mg te zien.

Bij de bespreking van het onderzoek van Van Slyke merkte ik reeds op, dat bij eenzelfde melk de opeenvolgende sedimenten een vermindering in het gehalte aan triphosfaat per gram caseïne te zien gaven.

Uit de cijfers van De Kadt werden voor opeenvolgende sedimenten van eenzelfde melk berekend:

Melkmonsters	mg $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ per gram caseïne		
	sed. 1	sed. 2,	sed. 3
a.	68	59	—
b.	61,5	59	—
c.	59,5	55	50,5
d.	60,5	59,5	—
e.	63	56,5	—

Dit lijkt mij eenerzijds een argument tegen een chemische binding, anderzijds zou, wanneer het een adsorptiequestie was, verwacht moeten worden, dat het eerste sediment met de grootste deeltjes de kleinste hoeveelheid  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  per gram had geadsorbeerd.

Wanneer wij de dubbelverbinding, zooals Pyne die voorstelt, vergelijken met die van De Kadt, dan heeft deze laatste m.i. de voorkeur. Immers, de polariseerbaarheid der  $\text{PO}_4$ -groep is veel groter dan die der carboxylgroep, daar de polariseerbaarheid van een anion toeneemt met zijn lading, wat dus inhoudt, dat zich eerder een zout vormt.

Het Ca-ion werkt door zijn kleinheid sterk polariseerend; het kan met zijn electrisch veld direct het anion naderen. Om deze redenen zal de dubbelverbinding, indien deze reëel is, zeker aan het esterphosfaat zijn gehecht.

Powell & Palmer (27) onderzochten de stremming door leb van de caseïnaatcomplexen volgens Porcher.

Het is een feit, dat melk, die op temperaturen tot  $65^\circ\text{C}$ . verhit is, sneller stremt dan rauwe melk. Dit blijkt uit de onderzoekingen van Stassano & Talarico (28), Rupp (29) en Mattick & Hallett (30).

Deze laatste auteurs nemen tevens een hysteresis-achtig effect waar, waaronder moet worden verstaan dat een colloïdaal-systeem een na-effect van een voorafgaande behandeling vertoont.

Powell & Palmer zien dezelfde verschijnselen, die bij melk worden waargenomen, ook bij verwarming der caseïnaatphosphaatcomplexen. Verwarmen zij echter de calciumcaseïnaat- en



de calciumphosphaatoplossing afzonderlijk, dan heeft na menging der twee componenten het verwarmen geen invloed.

Het hysteresis-effect is dus afhankelijk van de aanwezigheid van het caseïnaat en het fosphaat samen gedurende het verwarmen. Zij concludeeren hieruit dat een chemische band, zooals György (11) Kometiani (20) en Pyne (18) veronderstellen, niet essentieel is, noch voor de lebstremming noch voor de hysteresis.

Eilers (58) maakt Röntgendiagrammen van ultracentrifugegelen, wrongels en van technische lebcaseïne, die tevens een vergelijkbaar fosphaatdiagram vertoonen. Deze laten slechts bij uitzondering, en dan nog slechts zeer vage, ringen zien, die afkomstig kunnen zijn van  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Hieruit besluit Eilers, dat geen kristallijn triphosphaat in rauwe melk aan de caseïne gebonden zal zijn.

De vraag, op welke manier het colloïdale triphosphaat aan de caseïne gebonden zal zijn, wil Eilers oplossen aan de hand van de zoutvorming in caseïne-phosphorzuurmengsels.

Bij potentiometrische titraties van phosphorzuur met  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  merkt Eilers op, dat de tijd, die men laat verlopen tusschen het toevoegen van het reagens en de aflezing van den potentiometer, grooten invloed heeft op het verloop van de kromme. Hij vergelijkt de curven verkregen door titratie met  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  met die, verkregen door titratie met KOH en merkt op, dat bij snelle titratie geen aanwijzing voor de vorming van  $\text{CaHPO}_4$  gevonden wordt, doch dat direct tricalciumphosphaat gevormd schijnt te worden in het gebied rond pH 5,9.

Bij langzame titratie blijkt eerst  $\text{CaHPO}_4$  gevormd te worden, hetgeen met een terugloopen der pH gepaard gaat.

Daar de titratiekromme door het ontstaan van di- of tricalciumphosphaat in sterke mate wordt beïnvloed en de vorming dezer zouten niet alleen van de zuurtegraad, doch eveneens van de aanwezige calciumionenconcentratie afhangt, werden titraties uitgevoerd van phosphorzuur met KOH bij aanwezigheid van meer of minder  $\text{CaCl}_2$ .

Bij juist voldoende calcium wordt het gevormde  $\text{CaHPO}_4$  omgezet in  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , hetgeen echter door de onoplosbaarheid van het dicalciumphosphaat zeer langzaam geschiedt. Indien er een groote overmaat calcium aanwezig is, blijkt het diphosphaat stabiel te zijn.

Door nu een caseïne-phosphorzuurmengsel met calciumhydroxyde te titreeren en van de zoo gevonden curve die voor de caseïne af te trekken, verkrijgt Eilers een vloeiende curve, die aangeeft, dat het baseverbruik voor de neutralisatie tot pH 9 aanmerkelijk hoger is dan noodig is voor de vorming van dicalciumphosphaat, doch wat minder dan noodig is voor tricalciumphosphaat.

Door titratie met  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  van een constante hoeveelheid caseïne (5 gram), waaraan oplopende hoeveelheden phosphorzuur (200, 400, 800 en 1000 mg) waren toegevoegd, werden de curven voor het phosphorzuur weer verkregen door vermindering met de caseïnecurve. Eilers zet nu tegen elkaar uit (met behulp der verkregen titratiecurven) de hoeveelheden phosphorzuur en de hoeveelheden  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , noodig voor hun neutralisatie van pH 4 tot pH 9.

Tevens berekent Eilers de lijn, die men verkrijgt, zoo men aanneemt, dat al het phosphorzuur in  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  wordt omgezet.

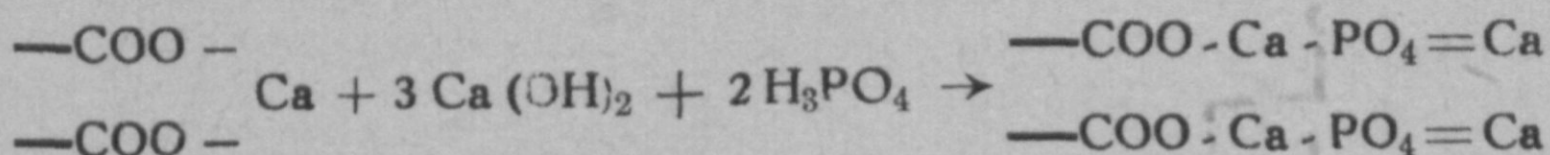
Hieruit blijkt, dat bij 200 mg phosphorzuur vrijwel de geheele hoeveelheid zuur in triphosphaat wordt omgezet, doch dat, naarmate meer phosphorzuur bij dezelfde hoeveelheid caseïne



wordt gebruikt, een grooter verschil tusschen de gevonden en berekende curve ontstaat, zoodat tenslotte een maximale hoeveelheid  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , n.l. 12.25 cm<sub>3</sub> 1 N als tricalciumphosphaat schijnt gevormd te kunnen worden.

Het op deze wijze gevormde tricalciumphosphaat hangt dus samen met de hoeveelheid van een beperkende stof, in casu de caseïne.

Eilers wil in deze gegevens een aanwijzing zien voor een calciumcaseïnaat-phosphaat-additie-verbinding, waarin de hoeveelheid phosphaat beperkt wordt door het reactievermogen der caseïne:



Het blijkt, dat in de dubbelverbinding viermaal zooveel calcium gebonden kan worden als door de caseïne.

Het verschil tusschen de gevonden en de theoretische verhoudingslijn wordt door deze beschouwing nog niet opgehelderd. Voor de verklaring voor dit tekort aan gebonden calcium denkt Eilers aan de mogelijkheid, dat een deel van het phosphorzuur gebonden zou zijn aan het calcium van twee zure groepen, terwijl de derde hydroxylgroep niet zou reageeren.

Apart moet ik hier nog melding maken van een onderzoek van Guittonneau en Brigando (1), omdat van dit onderzoek gebruik is gemaakt bij het eigen werk.

Zooals in de inleiding reeds werd vermeld, wordt hierbij gebruik gemaakt van de eigenschap van bepaalde micro-organismen om, wanneer deze te zamen met melk worden verhit, aan deze melk  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  te onttrekken.

Dit uit zich hierin, dat de betreffende microben niet meer kleurbaar zijn met een methyleenblauwoplossing doordat een huidje van  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  op de bacteriën wordt gevormd en de oplossing van methyleenblauw niet meer door kan dringen. Worden de bacteriën echter met een verdund zuur behandeld, dan verdwijnt het calciumphosphaat en zijn de microben weer kleurbaar.

Verhit in een calciumcaseïnaat-calciumphosphaatcomplex, bereid volgens de techniek van Porcher (2), vertoonen de micro-organismen ditzelfde verschijnsel, doch bij verhitting in lebwei niet.

De auteurs concludeeren hieruit: „On peut admettre qu'une réaction d'ordre physique ou chimique intervient entre les couches superficielles des membranes microbiennes ou les capsules qui les recouvrent d'une part et d'autre part un élément colloïdal du milieu en l'espèce les phospho-caséïnates. Cette réaction, amorcée déjà à la température ordinaire, s'exagérerait sous l'influence du chauffage et elle aboutirait ou non, suivant les cas, à la formation d'une enveloppe protectrice résistant à certains colorants.”

Guittonneau & Béjambes (31) bepaalden quantitatief het op de bacteriën gehechte Ca en P. Zij centrifugeerden hiertoe de bacteriën af, en waschten het centrifugaat met 1/10 N NaOH en met gedestilleerd water.

Door de bacteriesuspensie in gedestilleerd water lieten zij  $\text{CO}_2$  borrelen, waardoor Ca en  $\text{PO}_4$  oplosten. De bacteriën werden nu zorgvuldig afgefiltreerd en in de heldere vloeistof werden de gehalten aan Ca en P bepaald.

De mol-verhouding  $\text{Ca}/\text{PO}_4$  bleek nu zeer nabij 1,5 te liggen, wat dus doet veronderstellen, dat het phosphaat als  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  aanwezig zal zijn.



Door een kleurmethode volgens Kossa (32) karakteriseerden Guittonneau & Bédambes het op de microben gebonden neerslag ook als calciumphosfaat.

Uit het feit, dat chromoresistente bacteriën uit de verwarmde melk afgescheiden, gewasschen en met  $\text{CO}_2$  behandeld, waardoor de kleurbaarheid weer hersteld wordt, opnieuw chromoresistent worden door verwarming in melk, concludeeren de schrijvers, dat er geen chemische binding tusschen het calciumphosfaat en de buitenste laag der bacteriemembraan kan bestaan. Zij zien, integendeel, hierin een bewijs, dat de buitenste laag van het membraan de phosphaten door adsorptie vasthoudt



## EIGEN ONDERZOEK

### HOOFDSTUK IV.

#### Het verhitten van melk met gisten.

##### Oriënteerende proeven.

Bij het hieronder beschreven onderzoek werd gebruik gemaakt van de besproken eigenschap van sommige bacteriën om calciumphosphaat aan zich te binden, zoo deze in melk gesuspenderd, verhit worden.

Door verschillende factoren bij de verwarming te varieeren hoopte ik uit de analyseresultaten een inzicht te verkrijgen in de ontketende reacties en tevens tot een schema te komen hoe het calciumphosphaat in melk door de caseïne in oplossing wordt gehouden. Daar de door Guittonneau (1) bij zijn proeven gebruikte melkzuurbacteriën slechts na een tijdrovend kweek- en reinigingsproces zijn te verkrijgen, leek het mij gewenscht na te gaan of in den handel verkrijgbare persgist de genoemde eigenschap ook bezat.

Nu wordt voor het kweken van gist vaak gebruik gemaakt van een voedingsvloeistof met superphosphaat en hierdoor zal het niet onmogelijk zijn, dat de handelsgist met phosphaat verontreinigd is; dit diende dus eerst te worden nagegaan.

Hiertoe werden van verschillende monsters gist suspensies gemaakt door 3 gram gist van elk monster te schudden met 100 cm<sup>3</sup> gedestilleerd water, waarna een scheiding van de gisten van het water volgde door 5 minuten centrifugeeren met een snelheid van 3500 omwentelingen per minuut. De bovenstaande vloeistof is dan geheel helder en kan gemakkelijk worden gedecanteerd, doordat de gisten een stevig samenhangende koek onder in de centrifugebuis vormen. Op deze wijze werd driemaal met versch gedestilleerd water uitgewasschen waardoor eventueel oplosbaar calciumphosphaat geacht werd verwijderd te zijn. Zoo er echter onoplosbare calciumzouten of phosphaten in de gist aanwezig zijn, of zoo deze zouten aan de gisten zijn gebonden, zullen deze nog in het centrifugaat aanwezig zijn.

De met gedestilleerd water uitgewasschen gist werd nu in 0,001n HCl gesuspenderd en gecentrifugeerd. In de gedecanteerde heldere zure oplossing werd gereageerd op Ca en PO<sub>4</sub>, waarbij bleek, dat in een der vier onderzochte monsters deze reacties positief uitvielen.

Het uitwasschen met water is dus niet in alle gevallen betrouwbaar; daarom werden de vier monsters, in plaats van met water, driemaal met 0,001 n HCl uitgewasschen. In het laatste centrifugaat konden geen Ca of PO<sub>4</sub> meer worden aangetoond. De gisten worden dus op deze manier ontdaan van onopgelost of aan de gisten gebonden calciumphosphaat.

Om het in het centrifugaat aanwezige HCl te verwijderen werd de reiniging besloten met het uitwasschen met gedestilleerd water. Wanneer er hier verder over gist wordt gesproken, wordt hiermede gist bedoeld, welke driemaal met 0,001 n HCl en eenmaal met aq. dest. is uitgewasschen.

##### Beschrijving der toegepaste methode.

Daar de melk aan bacteriële veranderingen onderhevig is en hierdoor ongewenschte complicaties zouden kunnen optreden, werd er steeds naar gestreefd deze mogelijke complicaties uit



te schakelen door voor het onderzoek melk in verschen toestand te gebruiken. Door gemengde melk te nemen werden individuele verschillen tot een minimum beperkt. Deze melk werd met een Westphalia centrifuge ontroomd, waardoor ondermelk werd verkregen met ongeveer 0,1% vet. De zuurtegraad en de bacteriële reinheid werden steeds gecontroleerd.

Na de toevoeging van gist aan de melk werd deze goed geschud om een homogene suspensie te verkrijgen en de gistcellen zoveel mogelijk los van elkaar te hebben, daar deze de neiging vertoonen samen te klonteren.

Na deze melkgistsuspensie op de gewenschte temperatuur te hebben verhit, werd ze na afkoeling quantitatief in een Eccocentrifugebuis gebracht en gedurende 5 minuten gecentrifugeerd met een snelheid van 3500 r/m.

Het is natuurlijk, zooals men zal begrijpen, noodzakelijk, dat de gisten door het centrifugeeren quantitatief van de melk worden gescheiden, wat kan worden gecontroleerd door tellingen volgens de methode Breed (33) voor en na het centrifugeeren.

De volgende proef laat zien, dat de verwijdering der gisten na verhitting bij de genoemde omwentelingssnelheid gedurende 5 minuten voldoende kan worden geacht.

Aantal gistcellen per cm <sup>3</sup> melk.		% gecentr. gist
voor centrifugeeren	na centrifugeeren	
7,5 miljoen	0	100
15        "	0	100
45        "	100.000	99,8
90        "	300.000	99,7
150       "	500.000	99,7

De gisten, bezwaard met het er aan gebonden calciumphosphaat, werden dus zeer gemakkelijk gesedimenteerd. Alvorens nu het hierop gebonden Ca en PO<sub>4</sub> te bepalen, dienen wij eerst de Ca en PO<sub>4</sub> bevattende melkvloeistof, die nog in het centrifugaat aanwezig was, te verwijderen.

De gistkoek werd hoertoe weer in gedestilleerd water gesuspendeerd en gecentrifugeerd en de bovenstaande vloeistof afgegoten welke bewerking driemaal werd herhaald. Het laatst verkregen centrifugaat werd nu behandeld met 0,001 n HCl en na de gisten hieruit verwijderd te hebben, werden in de verkregen heldere oplossing Ca en PO<sub>4</sub> bepaald.

Ca werd als oxalaat neergeslagen en met kaliumpermanganaat getitreerd. De PO<sub>4</sub>-bepaling werd volgens Lorenz uitgevoerd.

#### De betrouwbaarheid der methode.

1. Een eerste vereischte bij het toepassen dezer methode is wel dat er goed kloppende duplo's worden bepaald.

Hier volgen eenige onderzoekingen, waarbij 3 monsters melk in duplo met uiteenlopende hoeveelheden gist werden verhit. Het hierdoor op de gisten gebonden calciumphosphaat werd geanalyseerd.

	Gistsediment			
	mg Ca	mg PO <sub>4</sub>	mg Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	mol. Ca/PO <sub>4</sub>
melk a	39,4	64,2	103,6	1,46
	40,2	66,3	106,5	1,44
melk b	52,0	83,3	135,3	1,48
	52,6	82,5	135,1	1,51
melk c	27,3	42,5	69,8	1,53
	28,0	43,0	71,0	1,54



De methodiek is dus betrouwbaar, daar de gevonden verschillen niet grooter zijn dan men bij de foutengrens der chemische bepalingen kan verwachten.

Tevens wil ik hier wijzen op de moleculaire verhouding  $\text{Ca}/\text{PO}_4$ , die schommelt om de theoretische waarde 1,5 van  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

2. Is het Ca en  $\text{PO}_4$ , die na centrifugeering van een verwarmde gistmelksuspensie in het sediment worden gevonden, aan de gisten gebonden of zijn deze bestanddeelen onafhankelijk van, doch wel gelijktijdig met de gisten door het centrifugaalveld als  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  verwijderd?

Wanneer dit laatste het geval is, mag men veronderstellen, dat, wanneer men melk zonder gisten verhit en centrifugeert, dit neergeslagen triphosfaat als sediment zal worden teruggevonden. Dit werd op de volgende wijze nagegaan:

- a. in twee kolfjes werden 100 cm<sup>3</sup> melk gepipetteerd.
- b. in twee kolfjes werden 100 cm<sup>3</sup> melk gepipetteerd en 2 cm<sup>3</sup> gistsuspensie.
- c. ter controle werd aan 2 kolfjes elk met 100 cm<sup>3</sup> water, 2 cm<sup>3</sup> gistsuspensie toegevoegd.

De toevoeging bedroeg ongeveer 60 miljoen gisten per cm<sup>3</sup> vloeistof.

Deze 6 kolfjes werden tegelijkertijd in een autoclaaf gedurende 10 minuten op 110° C verhit, waarna, na afkoeling, de diverse vloeistoffen 5 minuten werden gecentrifugeerd met een snelheid van 3500 r/m.

Uit de melk zonder gisten ontstond zeer weinig sediment, dat echter evenals de andere sedimenten op de beschreven wijze werd uitgewasschen, waarna de gehalten aan Ca en  $\text{PO}_4$  met het volgende resultaat werden bepaald:

	mg Ca	mg $\text{PO}_4$	mol. $\text{Ca}/\text{PO}_4$
a	0	0	—
	spoor	0	—
b	27,3	42,5	1,53
	28,0	43,0	1,54
c	0	0	—
	0	0	—

Uit deze proef moet dus de conclusie worden getrokken, dat Ca en  $\text{PO}_4$ , die op de beschreven methode werden bepaald, aan de gisten zijn gebonden en niet als onafhankelijk  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in het sediment aanwezig zijn.

3. De gisten bevatten nucleïne-zuren met een hoog P gehalte en bij verhitting van gisten met water diffundeeren deze grootendeels uit de cellen in het water. Dit fosfaat zou aan de ontketende reacties bij de verhitte gist-melksuspensie deel kunnen nemen en op deze wijze een interpretatie van analyse-materiaal waardeloos maken.

Voor de betrouwbaarheid der methode is het dus noodzakelijk, dat zoo wij melk met gisten verwarmen, de som van het op de gisten gebonden  $\text{PO}_4$  (eventueel Ca) plus het gehalte aan  $\text{PO}_4$  (eventueel Ca) der gecentrifugeerde melk, gelijk is aan de oorspronkelijke gehalten der melk zonder gisten.

Teneinde dit na te gaan, werd het totale gehalte aan Ca en  $\text{PO}_4$  van de melk bepaald voor en na het toevoegen van de gist. Alle cijfers werden uitgedrukt in mg per 100 g melk, terwijl aan deze hoeveelheid melk 1 g vochtige gist werd toegevoegd.

De melk met gisten werd hierna verhit, waarbij verdamping natuurlijk moest worden uitgesloten daar hierdoor concentratieverandering zou optreden. De gisten met het gebonden calciumfosfaat werden nu op de gewone wijze gecentrifugeerd en het Ca- en  $\text{PO}_4$ -gehalte hierop bepaald en tevens het totale gehalte aan Ca en  $\text{PO}_4$  der op deze manier „ontgiste” melk.

Deze proef werd uitgevoerd met 2 monsters melk, waarbij mon-



ster I gedurende 20 minuten, monster II gedurende 30 minuten op 120°C werd verwarmd.

	mg per 100 g melk					
	op		in afgecentr.		totaal	
	't gistsedim.		melk			
	Ca	PO <sub>4</sub>	Ca	PO <sub>4</sub>	Ca	PO <sub>4</sub>
I. rauwe melk	—	—	—	—	116	260
r. melk + gist	—	—	—	—	116	270
verhitte melk	27,9	43,7	89,0	217,0	116,9	260,7
II. rauwe melk	—	—	—	—	127	273
id + gist	—	—	—	—	127	282
verhitte melk	50,2	78,0	76	198,0	126,2	276

Wij zien, dat 1 gram vochtige gist ongeveer 10 mg PO<sub>4</sub> en geen Ca bevat en dat bij verhitting in melk gedurende 20 minuten op 120°C de PO<sub>4</sub>-vermeerdering, die hierdoor kon ontstaan, binnen de foutengrens ligt. Bij langere inwerking op die temperatuur zou iets meer nucleïnephosphaat in de melk diffunderen, doch ook hier is dit zoo weinig, dat de daardoor veroorzaakte fout te verwaarlozen is.

#### Behandeling der gist met loog.

Men zou kunnen meenen, dat het Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> door de gist aan de melk zou worden onttrokken, omdat de met zwak zuur uitgetrokken gist in gedestilleerd water gedispergeerd. zuur reageert. Deze suspensie heeft n.l. een pH ± 5,5.

Het is bekend, dat zuren aan het complex Ca en PO<sub>4</sub> onttrekken totdat bij pH 4,6, het I.E.P. der caseïne, alle Ca en PO<sub>4</sub> in oplossing is gegaan (uitgezonderd natuurlijk het in de caseïne veresterd PO<sub>4</sub>).

Om hierin een inzicht te verkrijgen werd de reeds door verdund zuur gewasschen gist uitgewasschen met 0,1n NaOH, waarna nog een behandeling met gedestilleerd water volgde. De gistsuspensie reageerde nu neutraal en had een pH van even boven de 7.

Met deze op twee manieren behandelde gist werd nu in duplo een verwarmingsproef met melk ingezet.

Gistbehandeling		Sediment in milligrammen			
		Ca	PO <sub>4</sub>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	mol. Ca/PO <sub>4</sub>
normaal	1	69	110	179	1,49
	2	68	110	178	1,47
+ loogbehand.	1	71	114	185	1,48
	2	70	113	183	1,47

Wij zien eerder een vermeerdering in de hoeveelheid overgedragen calciumphosphaat, dan een vermindering, zoodat wij er zeker van kunnen zijn, dat de overdracht niet berust op een zuurfunctie der gisten.

Die vermeerdering bij de gist met loogbehandeling bedraagt ongeveer 3% en behoeft niet reëel te zijn. Het is n.l. vrijwel niet mogelijk, precies evenveel gisten per gram melk toe te voegen van twee partijtjes gist, zooals in het onderhavige geval. De eenige methode ter contrôle bestaat in het tellen der gisten in de melk volgens de methode van Breed (33).

Bij onze proeven voegen wij steeds eenige tientallen millioenen gistcellen per gram melk toe en een bepaling, op enkele pro-



centen nauwkeurig, is hiermede niet mogelijk, zooals blijkt uit het onderzoek van Van der Burg, De Kadt & Van Kreveld (34).

### Invloed der hoeveelheid gist.

Aan een reeks kolfjes ieder met 100 cm<sup>3</sup> melk, werden oplopende hoeveelheden gist toegevoegd. Vervolgens werden de kolfjes te zamen gedurende 20 minuten in een autoclaaf op 120°C verhit, waarna de hoeveelheid Ca resp. PO<sub>4</sub> op de gisten in elk kolfje werd bepaald en tevens berekend hoeveel calciumphosphaat per gram gist was gebonden.

De proef werd in twee series uitgevoerd, waarbij in het eene geval (1) de hoeveelheid gist met kleine hoeveelheden, in het andere geval (2) met wat grootere sprongen toenam.

	gist in g per 100 cm <sup>3</sup> melk	Sediment in milligrammen				mol. Ca/PO <sub>4</sub>
		Ca	PO <sub>4</sub>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Totaal	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> p. g gist	
1)	0,05	8,6	13,7	22,3	450	1,49
	0,10	15,0	24,3	39,3	393	1,47
	0,30	32,7	51,9	84,6	254	1,45
	0,60	50,0	83,1	133,1	222	1,44
	1,00	54,6	90,5	145,1	145	1,45
	1,50	67,0	109,0	176,0	117	1,46
2)	0,5	50	83	133	266	1,43
	1,0	67	109	176	176	1,46
	1,5	74	124	198	132	1,42
	2,0	77	130	207	104	1,41
	2,5	76	128	204	82	1,41
	3,0	79	133	212	71	1,41
	3,5	83	142	225	65	1,39

Bezien wij deze cijfers nader, dan blijkt, dat bij deze drastische behandeling met groote hoeveelheden gist, niet alleen de colloïdale kalk en phosphor, doch ook het overige Ca en PO<sub>4</sub> der melk hieraan deel moeten hebben. De 100 cm<sup>3</sup> oorspronkelijke melk bevatten totaal 112 mg Ca en 278 mg PO<sub>4</sub>.

Bij een gehalte aan caseïne van 2,60 % bevatte deze melk aan colloïdaal triphosphaat ± 148 mg.

Deze hoeveelheid colloïdaal phosphaat wordt verre overschreden, zoodat ook andere Ca en PO<sub>4</sub> aan de reactie moeten hebben deelgenomen. De hoeveelheid triphosphaat per gram gist neemt af met toenemende hoeveelheid gist. Dit doet de suggestie naar voren komen, dat wij te maken hebben met een adsorptieproces.

Wanneer wij met adsorptie te doen hebben, dan moeten wij hiervoor een adsorptie isotherm kunnen opstellen. Voor de adsorptie in verdunde oplossingen geldt de gewone adsorptie-isotherm van Freundlich (35)

$$a = kc^{1/n}$$

waarin k en n constanten zijn, a = de hoeveelheid geadsorbeerd per gram adsorbens  
c = de evenwichtsconcentratie.

Wij drukken de geadsorbeerde hoeveelheid per gram adsorbens uit, daar wij het niet in de (onbekende) oppervlakte-eenheid kunnen uitdrukken.

Neemt men de logarithme der formule:

$$\log. a = \log. k + 1/n \log. c$$

dan zien wij, dat log. a lineair afhankelijk is van log c, terwijl de adsorptie-exponent 1/n de helling der lijn aangeeft. Indien



wij bij onze gist-melk met een adsorptie te doen hebben, moeten wij een rechte vinden door de logarithmische waarden.

Wij stuiten hier op de moeilijkheid, dat wij niet weten welke concentratie wij voor het triphosphaat in de melk moeten nemen. Immers, het aanwezige triphosphaat (148 mg) wordt niet alleen overgedragen op de gisten, doch in het uiterste geval zelfs 225 mg.

Wanneer wij nu de gerechtvaardigde veronderstelling maken, dat ten slotte al de kalk als  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  op de gisten kan neerslaan, dan is in de melk dus met een Ca gehalte van 112 mg, 290 mg  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  mogelijk. Wij vinden dan de volgende waarden:

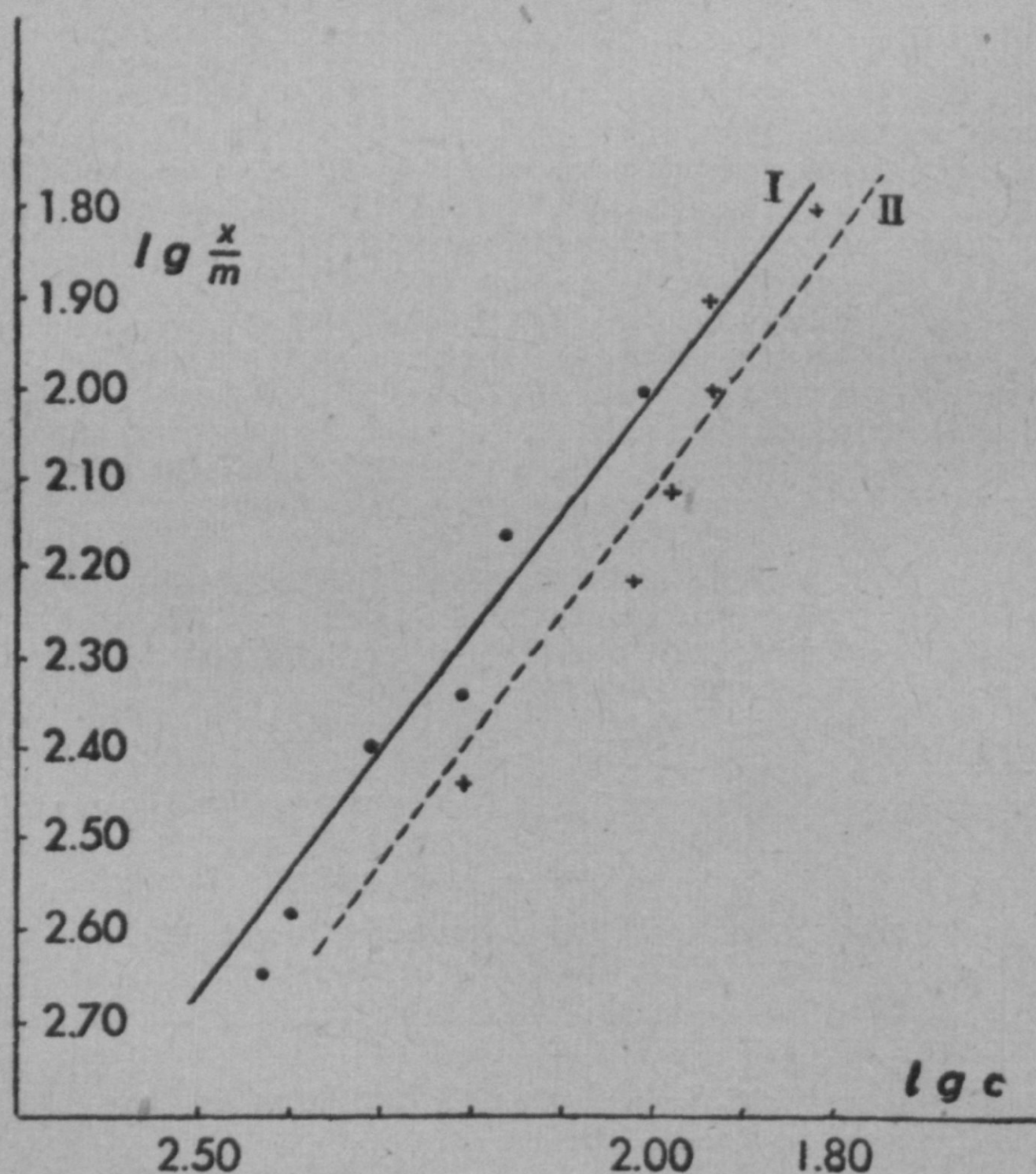
	x	$\frac{x}{m}$	log. $\frac{x}{m}$	c	log. c		x	$\frac{x}{m}$	log. $\frac{x}{m}$	c	log. c
1)	22,3	450	2,65	267,6	2,43	2)	133	266	2,425	157	2,20
	39,3	393	2,59	250,7	2,40		176	176	2,245	114	2,06
	84,6	254	2,40	205,4	2,31		198	132	2,12	92	1,97
	133,1	222	2,35	156,9	2,20		207	104	2,03	83	1,92
	145,1	145	2,16	144,9	2,16		204	82	1,91	86	1,93
	176,0	117	2,07	114,0	2,06		225	65	1,81	65	1,81

waarin x = de totaal geadsorbeerde hoeveelheid,

$\frac{x}{m}$  = het geadsorbeerde per gram gist,

c = 290-x.

Bijgaande grafiek laat zien, dat bij 1 en 2 nagenoeg rechte lijnen worden gevormd.





Daar de series 1 en 2 met verschillende monsters melk zijn uitgevoerd en de sterilisaties afzonderlijk zijn verricht, mag men niet verwachten, gezien de weinig reproduceerbare grof mechanische handeling van het verhitten, dat de lijnen samen zouden vallen.

#### De duur van de verwarming.

12 gram gist werd in een mortier met ongeveer 100 cm<sup>3</sup> melk (2,53 % caseïne) aangewreven tot geen kluitjes gist meer aanwezig waren. Deze gistsuspensie werd nu met melk verder aangevuld tot een volume van 1 liter en goed omgeschud. Microscopisch werd gecontroleerd, dat de gistcellen alle los van elkaar in de melk waren gesuspenderd.

Onder voortdurend omzwenken der „gistmelk” werd nu 9 maal 100 cm<sup>3</sup> pepipetteerd in 9 kolfjes. Aldus bevatten de kolfjes met groote nauwkeurigheid ieder 1,2 gram gist.

Een waterbad werd op 100°C gebracht en de kolfjes werden hierin geplaatst. Een ervan was voorzien van een thermometer ter controle van de temperatuur. De kolfjes werden met een kurk afgesloten om verdamping uit te sluiten, en ze werden af en toe in het waterbad omgezwenkt om het bezinken der gisten te voorkomen.

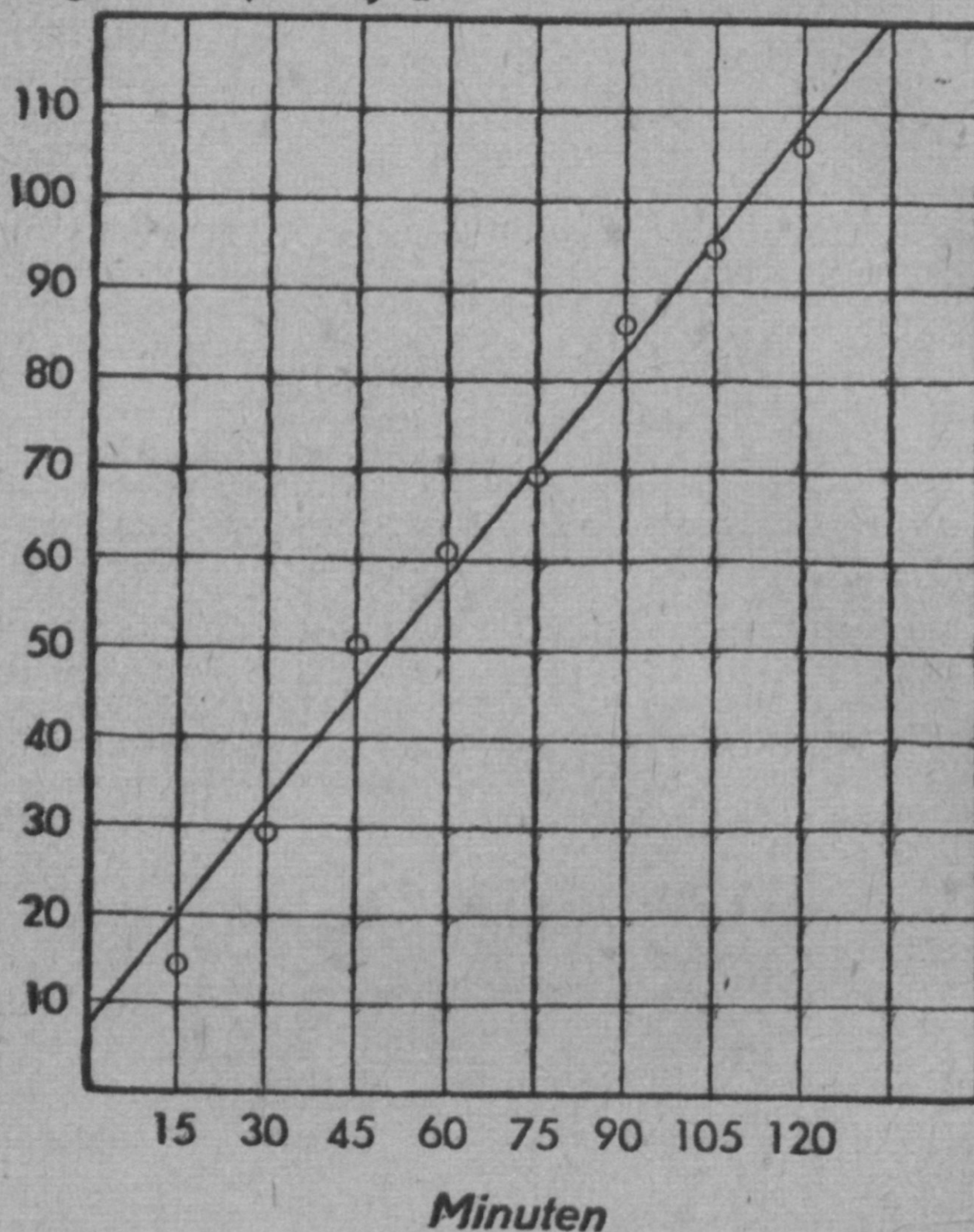
Zoodra de suspensies de gewenschte temperatuur hadden aangenomen, ( $\pm$  99,5 °C.) werd een stopwatch afgedrukt en om de 15 minuten een kolfje uit het waterbad genomen, dadelijk afgekoeld onder de waterleidingkraan en vervolgens werd dan op de gewone wijze het gehalte aan PO<sub>4</sub> en Ca op de gisten bepaald.

Tijd in min.	Sediment in milligrammen			
	Ca	PO <sub>4</sub>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	mol.Ca/PO <sub>4</sub>
op 99,5°C.				
15	5,4	8,7	14,1	1,53
30	11,7	17,6	29,3	1,58
45	19,8	30,3	50,1	1,54
60	24,4	37,2	61,6	1,56
75	27,3	42,4	69,7	1,53
90	33,6	52,0	85,6	1,60
105	36,5	57,6	94,1	1,50
120	40,7	64,2	104,9	1,50

Wanneer men deze cijfers in een grafiek uitzet, ziet men, dat er een rechte evenredigheid bestaat tusschen de tijd en het op de gist gebonden triphosphaat.



$mg\ Ca_3(PO_4)_2$



De lijn gaat niet door de oorsprong, wat te begrijpen is wanneer wij bedenken, dat wij onze proef begonnen zijn bij het bereiken van de temperatuur van  $99,5^{\circ}\text{C}$ . Er is dan al eenig triphosfaat door de gisten gebonden.

Een aantal onderzoekers hebben de veranderingen in de minerale constituenten der melk door verhitting nagegaan. Zoo komen Söldner (4), Boekhout & de Vries (36), Purvis, Brehant & Mc. Hattee (37) en Grosser (38) tot de conclusie, dat koken van melk resulteert in een gedeeltelijk neerslaan van het opgeloste calciumphosfaat.

Diffloth (39) vond dat verwarming van melk gedurende 30 minuten op  $60^{\circ}\text{C}$  de oplosbare phosphaten met 25,9 % deed afnemen en Milroy (40), dat de oplosbare kalk afnam door de melk een uur juist onder het kookpunt te houden.

Bell (41) vond een verlies aan opgeloste kalk en fosfaat, die correleerde met de temperatuur.

Magee en Harvey (42) vonden, dat het diffundeerbare gedeelte der kalk gereduceerd werd van 26 % tot 15 %, wanneer de melk gedurende een uur op  $100^{\circ}\text{C}$  werd gehouden, welk resultaat werd bevestigd door Orr, Crichton, Haldane & Middleton (43). Mattick & Hallett (3) verhitten op verschillende temperaturen en gingen de vermindering in diffundeerbare Ca en  $PO_4$  na, doch vonden niet als Bell een duidelijke correlatie met de temperatuur. Allen (44) komt bij de bestudeering van literatuur-materiaal tot de gevolgtrekking, dat bij verhitting van melk een aggregatie der colloïdale calciumphosfaat- en citraatpartikel-tjes plaats vindt en dat de mate van aggregatie, dus de grootte



der geaggregeerde deeltjes, zal afhangen van de aanwezigheid van vlokkende electrolyten.

Ik moet hier nu even op het onderzoek met de Sharples-centrifuge vooruitloopen. Door verwarming van melk wordt hierbij ook een geringe vermindering aan opgelost Ca en  $\text{PO}_4$  in de wei geconstateerd, waarbij het echter geen verschil uitmaakt of tijdens de verhitting wel of geen gisten in de melk zijn gesuspendeerd. De uit de wei verdwenen hoeveelheden Ca en  $\text{PO}_4$  bedragen slechts een fractie van die, welke op de gisten is neergeslagen.

Dit op de gisten gebonden  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  moet dus bijna geheel aan de caseïnaatphase zijn onttrokken.

Wanneer wij echter met een rechtstreeksche overdracht van het caseïnaat op de gisten te doen hebben, moeten wij daarbij het volgende bedenken. Uit de onderzoeken van Ling (24) en De Kadt (25) blijkt, dat gemiddeld ongeveer 56 mg  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  per gram caseïne in oplossing wordt gehouden. In ons geval mogen wij dus aannemen, dat de melk ongeveer  $2,53 \times 56 = 143$  mg  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  bevatte. Na 75 minuten is hiervan ongeveer de helft en na 120 minuten ongeveer 70% door de gisten gebonden. Wij zouden dus bij een directe omzetting een zeer duidelijke vermindering in de snelheid der reactie mogen verwachten.

Afgezien van de geringe vermindering, blijkt de concentratie aan opgeloste Ca en  $\text{PO}_4$  echter constant te zijn. Wanneer deze dus het  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  aan de gisten leveren, is de rechtevenredigheid bij constante temperatuur dus verklaard. De aan de wei door de gisten onttrokken hoeveelheden moeten dan door het caseïne-complex weer worden aangevuld.

Ik kom dus tot de volgende theorie. Het calciumcaseïnaat-calciumphosphaatcomplex splitst onder invloed van toegevoerde warmte kalk en phosphor in de wei af. In de wei slaat hierdoor  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  neer, dat aan de gisten gebonden wordt.

Ook is het mogelijk, dat door verhitting in melk, evenals dit in wei het geval is, opgeloste kalk en phosphor als  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  neerslaan en het tekort, dat hierdoor in de wei aan opgeloste Ca en  $\text{PO}_4$  ontstaat, onder invloed der warmte door het caseïnaatcomplex wordt aangevuld. In het eerste geval is dus de afsplitsing primair en in het tweede geval het neerslaan als  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

#### Invloed van citraat en suikertoevoeging.

Voor het neerslaan van  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ten gevolge der verhitting van melk uit de opgeloste toestand in het melkserum, zouden wij een groote steun krijgen, indien wij de oplosbaarheid voor kalkphosphaten in de melk zouden kunnen verhoogen. Immers, men zou dan moeten verwachten, dat hierdoor de hoeveelheid van het op de gist neerslaande triphosphaat zal verminderen.

De oplosbaarheid kunnen wij verhoogen door het toevoegen van oplosbare citraten en tevens door toevoeging van rietsuiker.

Rietsuikeroplossingen hebben n.l. de eigenschap calciumphosphaten op te lossen, doordat zij verbindingen kunnen aangaan met kalk. Hiermede willen Leighton & Mudge (45) de verschillen in warmtestabiliteit verklaren tusschen zonder en met suiker verwarmde melk.

De proeven werden nu zoo ingericht, dat het aantal gisten per  $\text{cm}^3$  gelijk bleef en de totale hoeveelheid melk eveneens. Als contrôle werd een verdunning met gedestilleerd water ingezet, waarvan wij natuurlijk geen invloed zullen kunnen verwachten, gezien de uiterst geringe oplosbaarheid van triphosphaat in water.

Men moet de proeven met water, suiker en natriumcitraat niet met elkaar vergelijken, daar de uitvoering geschiedde met ver-



schillende monsters melk en tevens de duur der verhitting en de temperatuur bij de proeven wisselden. Men moet dus de series afzonderlijk beschouwen.

Proef A. Toevoeging van water.

	Sediment in milligrammen			
	Ca	PO <sub>4</sub>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	mol.Ca/PO <sub>4</sub>
1. 50cm <sup>3</sup> melk + a g gist	32,1	50,8	82,9	1,50
2. 50cm <sup>3</sup> melk + 50 cm <sup>3</sup> aq.dest. + 2a g gist	32,1	51,1	83,2	1,49
Proef B. Toevoeging van rietsuiker.				
zonder suiker	48	76	124	1,51
10% suiker	44	68	112	1,53
20% suiker	38	62	100	1,46
40% suiker	24	36	60	1,58
Proef C. Toevoeging van natriumcitraat.				
zonder citraat	67	85	142	1,85
met 0,2% citraat	53	74	127	1,69

#### Discussie der verkregen resultaten.

Wij zien dat door de toevoeging van water geen verandering in de overdracht van triphosfaat op de gisten plaats vindt, wat wij ook niet verwachtten, gezien de geringe oplosbaarheid van het fosfaat in water.

Bij toevoeging van rietsuiker en citraat zien wij een duidelijke vermindering in de overdracht, wat ik wil toeschrijven aan de verhoogde oplosbaarheid van het tertiaire calciumzout in de continue phase. Immers, bij eenzelfde temperatuur en gelijke duur zal uit de continue phase des te minder Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> neerslaan, naarmate het hierin beter oplosbaar is.

Tegen B zouden wij kunnen aanvoeren, dat de hoge suikerconcentratie de viscositeit van het stelsel zoo vermeerdert, dat de overdracht vertraagd wordt, hadden wij niet proef C, waar de viscositeit slechts weinig wordt veranderd door de citraat-toevoeging. Het citraat bestond uit een mengsel van citroenzuur en natriumcitraat, dat in oplossing eenzelfde pH had als de melk.

Ik kom door deze proeven tot de volgende redeneering.

In melk komt een calciumcaseïnaat-calciumfosfaatcomplex voor dat niet, en calcium en fosfaat, die wel in de continue-phase zijn opgelost. Door verhitting van het systeem melk slaat een gedeelte van het in de continue-phase opgeloste calcium en fosfaat neer in de vorm van het tertiaire calciumfosfaat. Als er gisten in de melk zijn gesuspenderd, wordt dit Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> hieraan gebonden. De hoeveelheid aan de gisten geadsorbeerd Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> kan echter niet worden verantwoord door het uit de continue-phase verdwenen calcium en fosfaat. De gevonden recht-evenredigheid tusschen het op de gisten gebonden neerslag met de tijd induceert, dat steeds evenveel opgeloste Ca en PO<sub>4</sub> in de continue-phase aanwezig moet zijn, wat dus alleen mogelijk is zoo aan de continue-phase door het onoplosbaar gedeelte, in casu het calciumcaseïnaat-calciumfosfaatcomplex steeds zooveel nieuw opgeloste calcium en fosfaat worden afgestaan als er door het neerslaan als Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> door de gisten aan worden onttrokken, of het afstaan van Ca en PO<sub>4</sub> door het complex aan de continue-phase heeft bij bepaalde temperatuur en duur der verhitting het neerslaan van Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ten gevolge.

De concentratie aan opgelost Ca en PO<sub>4</sub> blijft dus steeds zoodanig, dat bij de gegeven temperatuur in de continue-phase Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> wordt neergeslagen en aan de gisten gebonden.



## HOOFDSTUK V.

### Verhitting van melk zonder gisten.

In het vorige hoofdstuk werd een theorie ontwikkeld over de processen, die zich afspelen in de kalk- en fosphaathuishouding van melk, zoo men deze met een gistsuspensie verwarmt. De vraag komt nu onmiddellijk naar voren wat er met dit systeem gebeurt, indien wij de melk zonder gisten verhitten.

In hoofdstuk IV onder no. 7 zagen wij, dat de daar geciteerde auteurs allen een vermindering constateerden in Ca en  $\text{PO}_4$  in de continue-phase, zoo de melk werd verhit. Het ongeloste Ca en  $\text{PO}_4$  zouden dan overgaan in onoplosbaar fosphaat.

Wanneer de ontworpen theorie juist is, zal het onverschillig zijn of het neergeslagen calciumfosphaat op de gisten wordt gebonden of niet. Immers, in beide gevallen worden opgelost Ca en  $\text{PO}_4$  aan de continue-phase onttrokken en deze zullen dan worden aangevuld door het calciumcaseïnaat-calcium-fosphaatcomplex. Men krijgt dus zoo een steeds toenemende hoeveelheid geprecipiteerd calciumfosphaat in het serum, indien niet een der andere melkconstituenten de rol der gisten overneemt en dit neerslag op zich bindt.

Wanneer aan een tevoren reeds verwarmde melk nu een gistsuspensie wordt toegevoegd en deze gist-melksuspensie wordt opnieuw verwarmd, zal men, ingeval het geprecipiteerde calciumfosphaat vrij in de continue-phase zweeft, mogen verwachten, dat behalve het reeds genoemde neerslag ook het zich opnieuw vormend triphosphaat zich aan de gisten zal binden. Om dit uit te maken werden de volgende proeven gedaan:

- 100  $\text{cm}^3$  melk, waaraan een gistsuspensie was toegevoegd, werd 30 minuten op  $100^\circ \text{C}$  verwarmd. Op de gewone wijze werd hierna het op de gisten gebonden Ca en  $\text{PO}_4$  bepaald.
- 100  $\text{cm}^3$  melk werd 30 minuten op  $100^\circ \text{C}$  verwarmd, waarna de melk werd afgekoeld. Aan deze aldus voorverwarmde melk werd nu één  $\text{cm}^3$  gistsuspensie toegevoegd en deze melk-gistsuspensie werd opnieuw 30 minuten op  $100^\circ \text{C}$  gehouden. De gisten werden nu weer afgecentrifugeerd en het Ca en  $\text{PO}_4$  hierop gebonden, bepaald.
- 100  $\text{cm}^3$  melk met 1  $\text{cm}^3$  gistsuspensie werden 60 min. op  $100^\circ \text{C}$  verwarmd, de totale warmte, die onder b. aan de melk wordt gegeven.

De resultaten waren als volgt:

#### eerste proef

melkmonster	Ca	sediment in milligrammen		
		$\text{PO}_4$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	mol, Ca/ $\text{PO}_4$
a	24,9	36,8	61,7	1,60
b	3,0	3,6	6,6	1,90
c	42,8	60,7	107,5	1,51

De proef werd nu herhaald, doch tevens werd nu de verwarmingstemperatuur hoger genomen dan de temperatuur der voorverwarming zonder gisten.

#### Tweede proef.

- 100  $\text{cm}^3$  melk met 1  $\text{cm}^3$  gistsuspensie werd 25 min. op  $100^\circ \text{C}$  verwarmd en nadat de gisten afgecentrifugeerd waren, werden hierop Ca en  $\text{PO}_4$  bepaald.



- b. 100 cm<sup>3</sup> melk werd 25 min. op 100 °C verwarmd, hierna werd 1 cm<sup>3</sup> gistsuspensie toegevoegd en werd weer 25 min. op 100 °C verwarmd, waarna Ca en PO<sub>4</sub> op de gisten werden bepaald.
- c. De voorbehandeling was als onder b, doch na de gist-toevoeging werd 25 min. op 120 °C verwarmd.
- d. 100 cm<sup>3</sup> melk werd met 1 cm<sup>3</sup> gistsuspensie direct 25 min. op 120 °C verwarmd en Ca en PO<sub>4</sub> op de gisten bepaald.
- De volgende tabel geeft het analyse-resultaat:

	Sediment in milligrammen			
	Ca	PO <sub>4</sub>	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	mol. Ca/PO <sub>4</sub>
a.	4,3	6,5	10,8	1,58
b.	geen	geen	—	—
c.	12,6	19,5	32,1	1,53
d.	38,8	59,4	98,2	1,55

Wij constateeren, dat voorverwarming van de melk een zeer groote invloed heeft in dien zin, dat naverwarming van dezelfde melk met gist een sterke vermindering in de calciumphosphaat-overdracht te zien geeft.

Heeft de naverwarming met gist op dezelfde temperatuur plaats als de voorverwarming, dan zien wij, dat de overdracht praktisch teniet wordt gedaan.

Wordt de naverwarmingstemperatuur hooger gekozen dan de temperatuur der voorverwarming, dan heeft wel overdracht plaats, doch in veel geringere mate dan het geval is, indien zonder voorverwarming direct met gisten op die hoogere temperatuur wordt verwarmd.

De overdracht wordt door de voorverwarming tot op zekere hoogte geblokkeerd. Bij de eerste proef blijft de som van het Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> van a en b verre achter bij c, evenals bij proef 2 de som van het Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> van a en c bij d.

Al ben ik mij hierbij bewust, dat bij de grof mechanische bewerking van de warmtebehandeling in een autoclaaf geen groote nauwkeurigheid kan worden bereikt, toch zijn de verschillen zoo groot, dat deze fouten geen rol zullen spelen.

De verandering in de Ca- en PO<sub>4</sub>-huishouding in melk bij verhitting stel ik mij nu aldus voor: Opgelost Ca en PO<sub>4</sub> worden in het serum als triphosphaat neergeslagen en dit precipitaat wordt aan de melkeiwitten geadsorbeerd. Ook hier zal het calciumcaseïnaat-calciumphosphaatcomplex Ca en PO<sub>4</sub> aan de continue-phase leveren, waardoor dit proces voortgang kan vinden. Het proces geschiedt dus precies op dezelfde wijze als bij de melk met gisten, alleen in dit laatste geval accepteren de gisten het triphosphaat en in het eerste geval doet de caseïne dit. De gisten moeten dus veel gretiger het triphosphaat adsorbeeren dan de caseïne, wat induceert, dat het proces der overdracht bij melk zonder gisten trager zal zijn dan met gisten. Daar voorverwarmde melk bij naverwarming met gist op dezelfde temperatuur zoo goed als geen overdracht en bij naverwarming op hoogere temperatuur een vertraagde overdracht te zien geeft, moet dit secundair aan caseïne gebonden Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> in een andere vorm aanwezig zijn dan oorspronkelijk het geval was en tevens moet dit „omgezette” triphosphaat een zekere rem uitoefenen op de overdracht van het nog niet afgesplitste en als Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> weer geadsorbeerde kalk en phosphaat.



## HOOFDSTUK VI.

### SUPERCENTRIFUGEEREN

#### van verhitte melk.

##### Inleiding.

Door Hardy (46), Chick & Martin (47), Lepeschkin (48), Wu & Wu (49) en Lewis (50) is voor ei-albumine en oxyhaemoglobine aangetoond, dat warmtecoagulatie uit twee processen bestaat:

- a. denaturatie, of de verandering van het proteïne onder invloed van de warmte, welke vooraf moet gaan aan
- b. flocculatie, de afscheiding van het gedenatureerde eiwit in tegenwoordigheid van een geschikt electrolyt.

De mate der denaturatie van albumine en globuline bij verhitte melk wordt bepaald door de precipitatie van deze twee te zamen met de caseïne door die reagentia, die in onverwarmde melk de caseïne alleen neerslaan.

Orla Jensen & Plattner (51) vonden in melk, verhit tot 70 °C slechts een geringe coagulatie, doch constateerden, dat na een uur op 77,5 °C, 30 min. op 80 °C of 5 min. op 90 °C de albuminefractie compleet werd gecoaguleerd.

Freudenreich (52) vermeldt, dat 15—20 % der albumine en globuline gecoaguleerd worden na 30 minuten op 68—69,5 °C.

Weinlig (53) vond, dat gemiddeld 8,5 % van de oplosbare eiwitten onoplosbaar werden na 30 minuten op 60 °C en 40 % na 1 minuut op 80 °C.

Grimmer, Kurtenacker & Berg (54) vonden na 1 minuut verhitten een coagulatie van 5,7, 26,8, 62,0, 74,0 en 77,4 % bij 70°, 80°, 90°, 95° en 100° C respectievelijk.

Rowland (55) vond, dat bij temperaturen boven 100° C gedeeltelijk eiwit afbraak plaats had en dat bij 80° C in 60 minuten, bij 90° C in 30 minuten, bij 95° C in 10 à 15 minuten en bij 100° C in 5 à 10 minuten maximale denaturatie optrad.

##### De toestand der verhitte albumine in melk.

Uit al deze onderzoeken blijkt echter niet hoe de toestand der denatureerbare eiwitten in melk na verhitting is.

Immers, ze worden met de caseïne door zuur neergeslagen en het zou kunnen zijn, dat zij aan de caseïne waren gebonden (op de caseïne zijn geprecipiteerd), waardoor ze in suspensie zouden worden gehouden, daar men microscopisch geen verandering bij de melk kan waarnemen.

Tevens zou dit het effect kunnen hebben, dat de voorverwarmde melk na toevoeging van gist geen overdracht van het triphosfaat meer vertoont op die gisten, door blokkeering van het calciumphosfaat.

Ten einde dit uit te maken, werd gebruik gemaakt van de Sharplesupercentrifuge.

De melk werd daartoe een moment op 120 °C gebracht, waardoor alle albumine wordt gedenatureerd, waarna gefractionneerd werd gesupercentrifugeerd, waaronder moet worden verstaan, dat de melk eerst kort wordt gecentrifugeerd en het sediment en de bijbehorende „wei” geanalyseerd. Deze „wei” wordt nu opnieuw, doch langeren tijd gecentrifugeerd en in een sediment en hierbij behorende „wei” gescheiden.



Indien de gedenatureerde eiwitten aan de caseïne zijn gebonden, moet men deze in de sedimenten terugvinden en niet meer in de overblijvende „wei” vloeistof.

Indien de gedenatureerde eiwitten zijn gecoaguleerd zonder aan de caseïne te zijn gebonden, dan zal men al de gecoaguleerde eiwitten in het eerste sediment moeten verwachten.

#### **Analysemethoden voor gecentrifugeerde melk.**

Voor de analyse van het sediment wordt dit in water (1:10) verdeeld. Indien het door lang centrifugeeren nogal droog was, geschiedde dit bij 60 °C.

De oplossing wordt gepipetteerd, evenals de wei en de oorspronkelijke melk en tevens wordt gewogen, hoeveel er uit de diverse pipetten loopt, zoodat alle gehalten in gewichtsprocenten kunnen worden uitgedrukt.

#### **Drogestof.**

Van het sediment wordt het gehalte aan drogestof bepaald volgens de zandmethode, waarbij het zand-sedimentmengsel 3—4 uren bij 100—105 °C gedroogd wordt.

Van de wei en de melk wordt dit gehalte bepaald met de Mojonnierter. Zonder zand wordt hierbij op een heete plaat het water verdampt. Hierna werd nog 10 Minuten bij 105 °C in vacuo nagedroogd.

#### **Caseïne.**

Het gehalte hieraan wordt volgens Moir bepaald.

Een hoeveelheid stof, die ten hoogste 300 mg caseïne bevat (10 cm<sup>3</sup> melk, 10 cm<sup>3</sup> sediment 1: 10, 25 cm<sup>3</sup> wei) werd met water van 40° C verdund en wel de melk en het sediment tot een volume van 50 cm<sup>3</sup>, de wei tot 125 cm<sup>3</sup>.

Direct hierna wordt 1½ cm<sup>3</sup> 10 % azijnzuur toegevoegd en met de verdunning gemengd.

20 minuten na de toevoeging van het azijnzuur voegt men 5 cm<sup>3</sup> 0,225 n natriumacetaat toe.

Nadat de vloeistof eenigen tijd rustig gestaan heeft, wordt de caseïne afgefiltreerd en met zoo weinig mogelijk water uitgewasschen. Het neerslag wordt gedestruëerd.

Voor de berekening van het gehalte aan caseïne wordt het gehalte aan stikstof met 6,45 vermenigvuldigd.

#### **Albumine.**

Het bij de bepaling van caseïne verkregen filtraat wordt met Na OH op pH 5,5 gebracht, waarna het wordt opgekookt.

Hierna wordt het eenigen tijd op een waterbad verwarmd, waardoor het neerslag bezinkt.

De vloeistof wordt nu afgefiltreerd en het neerslag uitgewasschen. Het neerslag wordt hierna gedestruëerd en na destillatie het gehalte aan stikstof op de gewone manier bepaald.

#### **Totale stikstof.**

Een hoeveelheid materiaal als bij de bepaling van caseïne wordt in een Kjeldahlkolf gepipetteerd en gedestruëerd. De destructie gebeurt als volgt. Na toevoeging van 25 cm<sup>3</sup> sterk zwavelzuur en 600 mg kwik wordt op een kleine vlam verhit tot het schuimen ophoudt. Dan wordt 15 g kaliumsulphaat toegevoegd en op volle vlam tot wit gedestruëerd, waarna nog 1 à 2 uur op een flinke vlam wordt doorgekookt.

Na afkoeling worden een weinig puimsteen en 250 cm<sup>3</sup> water toegevoegd waarna met 125 cm<sup>3</sup> Kjeldahlloog (35% NaOH + 0,8% Na<sub>2</sub>S) de ammoniak wordt overgedestilleerd. Van het destructiezwavelzuur wordt geregeld een blinde proef ingezet.



## Calcium.

Een geschikte hoeveelheid stof wordt in een porceleinen schaaltje drooggedampt en na verbranding in de moffeloven tot wit verascht. Dan wordt de asch in een Erlenmeyer in sterk zoutzuur opgelost en overmaat oxaalzuur toegevoegd. Vervolgens wordt bij  $100^{\circ}$  met ammoniak voorzichtig het calcium als oxalaat neergeslagen en al schuddende doorgekookt om de overmaat ammoniak uit te koken. Na eenige uren staan wordt afgefiltreerd en met water uitgewasschen.

Het neerslag wordt met filter en al in  $100\text{ cm}^3$  water +  $25\text{ cm}^3$  4 N-zwavelzuur bij  $70\text{--}80^{\circ}\text{C}$  getitreerd met  $\text{KMnO}_4$  en voor het filter  $0,1\text{ cm}^3$  0,1 N afgetrokken.

## $\text{PO}_4$

Een geschikte hoeveelheid materiaal ( $10\text{ cm}^3$ ) wordt in een Erlenmeyer met  $1\frac{1}{2}\text{ cm}^3$  sterk zwavelzuur en eenige druppels salpeterzuur op de vrije vlam voorzichtig gedestruerd. Na afkoeling wordt met een weinig water verdund en weer opgekookt. Indien een neerslag van  $\text{CaSO}_4$  blijft bestaan, wordt dit afgefiltreerd en uitgewasschen tot  $50\text{ cm}^3$  filtraat. Indien de vloeistof helder blijft, wordt eveneens tot  $50\text{ cm}^3$  aangevuld. Hierna wordt de gedestruerde oplossing op  $100^{\circ}\text{C}$  gebracht, even omgeschud en  $50\text{ cm}^3$  sulfaatmolybdeen-reagens volgens Lorentz toegevoegd. Na eenige minuten staan, wordt een halve minuut goed geschud en na 2—18 uur gefiltreerd en uitgewasschen met ammoniumnitraat 2 %, alcohol en aether en ten minste  $\frac{1}{2}$  uur onder vacuum zonder droogmiddel gedroogd.

1 mg neerslag =  $0,04409\text{ mg PO}_4$ .

## Analyse der verhitte melk.

De verhitte melk (moment op  $120^{\circ}\text{C}$ ), werd in 3 fracties gesedimenteerd. De resultaten der melk-, sedimenten- en „wei” analyses waren als volgt:

	sed. 1	sed. 2	sed. 3	melk	wei 1	wei 2	wei 3
a. drogestof	24,3	25,6	28,2	9,31	8,83	7,61	6,75
b. tot. eiwit	17,5	19,1	22,2	3,48	2,95	1,79	0,93
c. cas. + alb.	16,6	18,2	21,3	3,10	2,58	1,46	0,61
d. rest-N	0,9	0,9	0,9	0,38	0,37	0,33	0,32
e. Ca	0,681	0,674	0,729	0,122	0,103	0,063	0,037
f. $\text{PO}_4$	1,344	1,316	1,415	0,311	0,276	0,201	0,151
g. $\text{PO}_4$ in cas. + alb.	0,389	0,412	0,461		0,053	80,027	0,0089
h. caseïne	15,6	16,5	18,4		2,15	1,08	0,36
i. albumine	1,0	1,7	2,9		0,43	0,38	0,25

Ter toelichting diene, dat de rest-N is berekend uit  $b-c = d$ . De caseïne (h) is berekend door het ester- $\text{PO}_4$  op 2,5 % aan te houden, dus door g met 40 te vermenigvuldigen.

De albumine is dus  $c-h = i$ .

## Discussie der resultaten.

Wij zien, dat de albumine niet in sediment 1 terecht is gekomen, zoodat wij moeten aannemen, dat ze niet als loszwevende gecoaguleerde deeltjes, zooals dat bij verhitting van wei het geval is, in verhitte melk aanwezig zal zijn.

Door langer centrifugeeren wordt bij de fracties wel meer albumine gesedimenteerd, doch de verhouding caseïne/albumine is in de fracties niet gelijk, n.l. 15,6; 9,7 en 6,4. De albumine zal dus niet aan de caseïne gebonden zijn.

Daar dus de wei-eiwitten bij verhitting van melk in gedenatureerde, doch niet gecoaguleerde toestand vrij in de melk blijven,



kan dit niet de oorzaak zijn van de verhinderde overdracht van triphosphaat op de gisten bij voorverwarmde melk.

### Het verminderde gehalte aan opgeloste kalk en fosphaat.

Uit de gevonden cijfers valt echter nog meer te constateeren en wel betreffende de vraag waar het door de verwarming der melk uit het serum verdwenen calcium en fosphaat blijft. Wij dienen hiertoe eenige waarden te berekenen, welke hier volgen.

	Sed. 1	Sed. 2	Sed. 3
1. gebonden water . . . . .	9,1	10,0	11,7
2. weivocht . . . . .	66,6	64,4	60,1
3. weicalcium . . . . .	0,075	0,044	0,024
4. wei-PO <sub>4</sub> . . . . .	0,201	0,140	0,097
5. tot. Ca - weicalcium = r + s . . . . .	0,606	0,630	0,705
6. (tot.-ester-wei) PO <sub>4</sub> = p . . . . .	0,754	0,764	0,857
7. mol. (r + s)/p . . . . .	1,91	1,96	1,95
8. caseïnecalcium = r . . . . .	0,164	0,173	0,194
9. triphosphaat calcium = s . . . . .	0,442	0,457	0,511
10. mol. s/p . . . . .	1,39	1,42	1,42
11. mg Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> per g caseïne . . . . .	76,6	74,1	74,4

- Deze waarden zijn aldus berekend.
- ad. 1. Het gebonden water werd op 55 % aangehouden (De Kadt, 25) hetgeen wil zeggen, dat 100 deelen caseïne plus albumine 55 deelen water binden, waarin geen lactose opgelost is. In de tabel van de sediment- en weianalyses heeft sed. 1c een gehalte van 16,6 % caseïne, het gebonden water is dus  $16,6 \times 0,55 = 9,1 \text{ cm}^3$ .
- ad. 2. Het weivocht in het sediment = tot. vocht — gebonden water.
- ad. 3. Het calcium in het weivocht in het sediment wordt aldus berekend. Het calciumgehalte in de wei 1 is 0,103, terwijl die wei een vochtgehalte heeft van  $100 - 8,83 = 91,17 \%$ . In sediment 1 is aanwezig 66,6 % weivocht, zodat dus het Ca in het weivocht bedraagt  $0,103 \times (66,6 : 91,17) = 0,075 \%$ .
- ad. 4. Deze waarde wordt op dezelfde wijze berekend als onder 3.
- ad. 5,
- 6, 7. Deze cijfers behoeven geen nadere toelichting.
- ad. 8. Een hoeveelheid Ca wordt hiervoor berekend aequivalent met het ester PO<sub>4</sub> (g), dus  $g \times 40/95$ .
- ad. 9. Het triphosphaat-Ca wordt berekend uit 5-8 of (r+s)-s

### Discussie der verkregen resultaten.

Dit komt neer op de interpretatie der gevonden verhoudingen sub 7, 10 en 11. Het beste kan dit geschieden aan de hand van het schema, waarin nu het caseïnecalcium aan het ester-PO<sub>4</sub> is gebonden:

$$R - \overset{(z)}{\text{PO}_4} = \overset{(r)}{\text{Ca}} \frac{\overset{(s)}{\text{Ca}_3} \overset{(p)}{(\text{PO}_4)_2}}{\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2}, \text{ waarin}$$

- z = het aan de caseïne R veresterd PO<sub>4</sub>.
- r = de aequivalente hoeveelheid Ca met z = caseïnecalcium.
- s = triphosphaatcalcium.
- p = het triphosphaat-PO<sub>4</sub>.
- r+s = het totale aan de caseïne gebonden calcium.

De verhouding sub 10 = s/p is constant en wijkt niet veel van de theoretische waarde 1,5 af.



Sub 7 = (r+s):p zien wij, dat een vrijwel constante verhouding wordt gevonden bij de verschillende fracties. Dit is het belangrijke punt, want het neergeslagen calciumphosphaat uit het serum is dus gelijkelijk over de caseïne fracties verdeeld, wat ook blijkt uit 11, het aantal milligrammen  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  per gram caseïne. Het aantal milligrammen  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  per gram caseïne moet dan echter ook zijn toegenomen door de verhitte der melk, wat hier niet uit blijkt, daar wij de rauwe melk niet hadden geanalyseerd.

De proef werd dus herhaald onder voorwaarden waarbij dit wel geschiedde.

	rauw					verhit				
	melk	sed. 1	sed. 2	wei 1	wei 2	melk	sed. 1	sed. 2	wei 1	wei 2
a. drogestof	9,22	27,4	33,2	8,67	6,79	9,07	24,3	33,0	8,67	6,78
b. tot. eiwit	3,43	21,2	27,6	2,87	1,05	3,32	18,0	27,1	2,91	1,02
c. caseïne	2,69	20,1	26,4	2,12	0,29*	2,99	17,0	26,3	2,53	0,66
d. albumine	0,39		0,26	0,38	0,39					
e. rest N	0,36		0,78	0,37	0,37	0,32	1,0	0,8	0,33	0,36
f. Ca		0,716	0,854	0,102	0,045	0,117	0,679	0,889	0,102	0,040
g. $\text{PO}_4$		1,401	1,664	0,255	0,149	0,281	1,319	1,720	0,253	0,140
h. caseïne $\text{PO}_4$										
i. % $\text{PO}_4$ in de caseïne cas. (berekend)	0,0681	0,544	0,672	0,572	0,0008	0,0641	0,437	0,620	0,0565	0,009
						2,15	2,57	2,36	2,23	1,50
							18,2	25,3	2,26	0,40

Opmerking: het caseïne- $\text{PO}_4$  is verkregen door het neerslag bij de bepaling van caseïne te destrueeren. Bij de verhitte melk dus in het caseïne + albumine neerslag.

\* = + albumine.

De volgende waarden werden hieruit weer berekend.

	Rauw		Verhit	
	sed. 1	sed. 2	sed. 1	sed. 2
weivocht	61,3	51,9	66,0	52,3
weicalcium	0,069	0,025	0,074	0,022
tot. weicalcium = r + s	0,647	0,829	0,605	0,867
caseïne calcium = r	0,229	0,283	0,184	0,261
triphosphaat calcium = s	0,418	0,546	0,421	0,606
wei- $\text{PO}_4$	0,171	0,083	0,183	0,079
triphosphaat- $\text{PO}_4$ = p	0,686	0,909	0,699	1,021
1) mol. (r + s)/p	2,24	2,17	2,06	2,02
2) mol. s/p	1,45	1,43	1,43	1,41
3) mg triphosph. p. g caseïne	54,6	55,0	61,6	64,2

Uit de verhouding sub 2, s/p blijkt, dat in rauwe zoowel als verhitte melk het colloïdale phosphaat vrijwel als het tertiaire calciumzout aanwezig is.

Uit de verhoudingen bij 1 of (r+s):p, die bij verhitte melk lager zijn dan bij de rauwe melk, moeten wij de conclusie trekken, dat bij de verhitte melk meer triphosphaat aan de caseïne is gebonden, dan bij de rauwe melk, wat duidelijk uitkomt in de verhoudingen bij 3, aangevende de hoeveelheid  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in mg gebonden aan een gram caseïne. Het in het serum oplosbare Ca en  $\text{PO}_4$  wordt dus bij verhitte der melk gedeeltelijk aan de caseïne gebonden.



Bij onze proeven met gist zagen wij, dat aan de continue-phase onttrokken calcium en phosphor weer wordt aangevuld door het calcium-phosphaat-calciumcaseïnaatcomplex. Er is geen reden om aan te nemen, dat ditzelfde niet zal geschieden, indien de caseïne de rol der gisten overneemt.

Bij verhitting der melk wordt dus  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in het serum neergeslagen. Dit neergeslagen  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  wordt aan de caseïne gebonden. Het tekort in het serum wordt aangevuld door het caseïnaat-phosphaatcomplex en slaat weer neer als triphosphaat en zoo door. De vorm, waarin het opnieuw door de caseïne wordt gebonden, moet dus een andere zijn, dan de vorm, waarin het in de oorspronkelijke, onverwarmde melk aanwezig was.

Immers, de overdracht van het triphosphaat wordt, zooals wij in hoofdstuk V zagen, na voorverwarming der melk zonder gisten in sterke mate verhinderd. Zoo de caseïne het Ca en  $\text{PO}_4$  weer aan zich bindt in dezelfde vorm als waarin het oorspronkelijk vóór de verwarming aanwezig was, zal van die rem geen sprake zijn. Wij zien uit de voorgaande cijfers, betreffende de vermeerdering per gram caseïne aan triphosphaat, dat het eerste stadium van de veronderstelde overdracht plaats heeft en dat de caseïne dus de rol der gisten heeft overgenomen. Er is dus geen onderscheid in methode, waarop de caseïne de rol der gisten overneemt, doch wel in de snelheid waarmede het proces zich afspeelt. Immers, uit de proeven in hoofdstuk V blijkt, dat een rem wordt gevormd op het afstaan van Ca en  $\text{PO}_4$  aan de continue-phase door de omzetting van Ca en  $\text{PO}_4$  via het serum in  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . De in hoofdstuk IV, onder 7 gevonden recht-evenredigheid bij constante temperatuur tusschen de tijd en de overdracht op de gisten, zal dus bij melk zonder gisten niet voorkomen, doch hier zal de snelheid van omzetting met den tijd afnemen.



## HOOFDSTUK VII.

### Adsorptie van caseïne aan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

#### Oriënteerende proef.

Zoo de caseïne in staat is neergeslagen triphosphaat te binden, moet het omgekeerd ook mogelijk zijn, dat  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  caseïne aan zich bindt.

Een calciumcaseïnaatoplossing, bereid uit caseïne, volgens Hammarsten en  $\text{CaO}$  volgens de techniek van Porcher (2) met een gehalte van 0,1 % caseïne en een pH 8,2, geconserveerd met een weinig mosterdolie, werd een nacht in een ijskast bewaard voor de instelling der evenwichten.

Aan kolfjes met 200  $\text{cm}^3$  dezer oplossing werden toegevoegd  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{CaCO}_3$  of  $\text{CaSO}_4$ , om na te gaan of ook andere onoplosbare kalkzouten werden gebonden.

Deze kolfjes werden gedurende 2 uur op een rollenbok gerold en hierna 10 minuten gecentrifugeerd (4000 r/m).

De onoplosbare zouten met of zonder gebonden caseïne, werden zoo van de oplossing gescheiden.

De vermindering in caseïnegehalte der oplossing moet nu uitsluitel geven over de binding van caseïne aan de onoplosbare zouten.

Een blanco proef deed zien, dat geen caseïnaat door het centrifugeeren zelf wordt gesedimenteerd, terwijl bij de zouten het  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  en  $\text{CaSO}_4$  wel, het  $\text{CaCO}_3$  geen caseïnaatbinding te zien gaven.

Bij contrôle blijken echter de oplossingen met fosphaat en sulfaat een pH 5,50 te hebben aangenomen, zoodat het nog zou kunnen zijn, dat hierdoor het effect teweeg was gebracht, daar de carbonaattoevoeging de pH niet had doen dalen.

Naast het  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  werd nu behalve  $\text{CaSO}_4$  iets carbonaat toegevoegd, waardoor de pH op 7,3 werd gehouden. Het bleek, dat nu wel  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , maar  $\text{CaSO}_4$  geen caseïne aan de oplossing heeft onttrokken.

#### Quantitatieve proef.

Aan een calciumcaseïnaatoplossing met 0,93 % caseïne pH 6,80, werd een weinig mosterdolie toegevoegd. Aan fleschjes met 100  $\text{cm}^3$  dezer oplossing werden toegevoegd 10, 5,  $2\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{2}$  en 0 gram  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , terwijl tevens in elk fleschje 0,5 gram  $\text{CaCO}_3$  werd gedaan om de pH constant te houden (de pH was in alle gevallen 7,2).

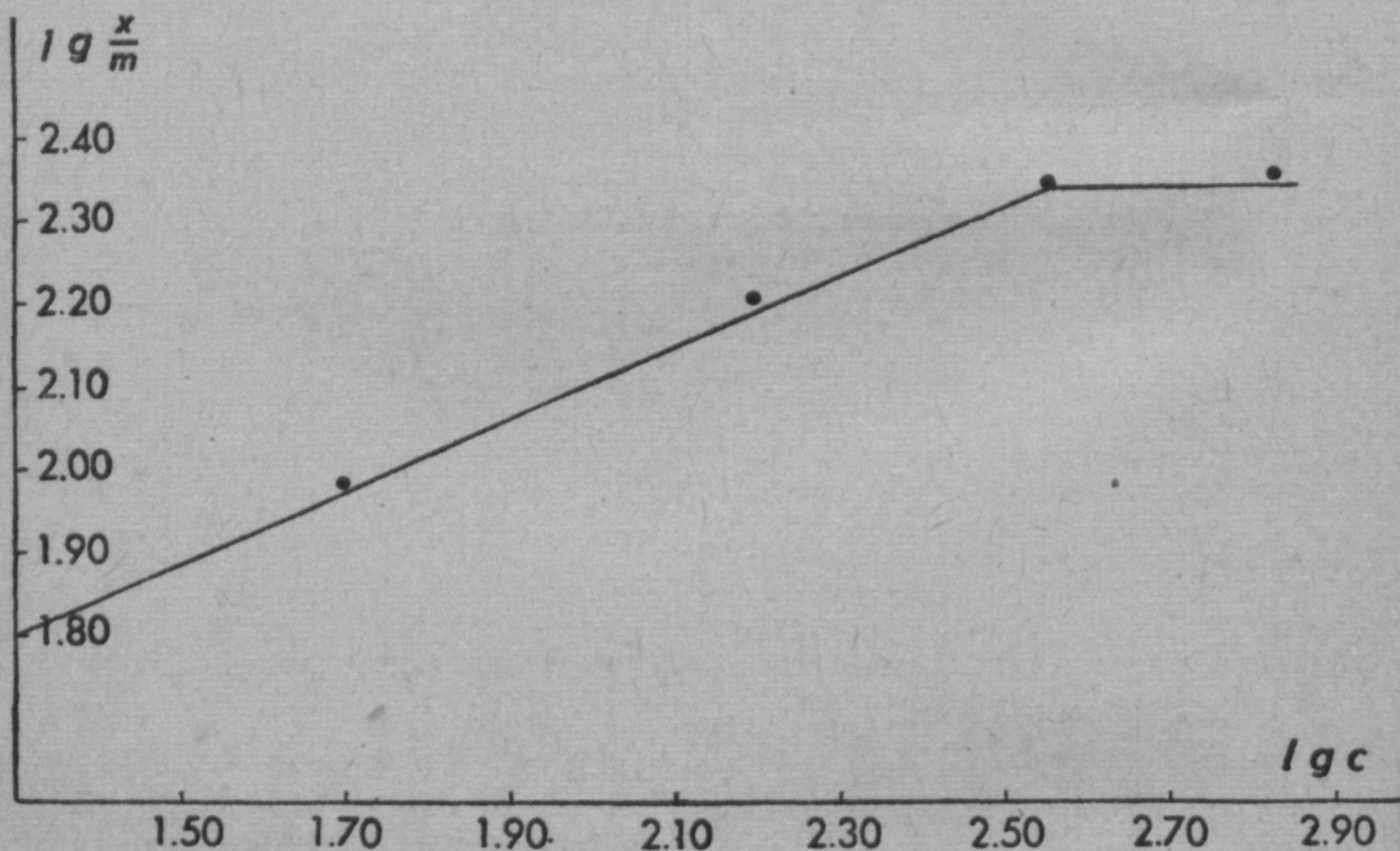
De fleschjes werden 4 uur bij  $25^\circ\text{C}$ . op de rollenbok gerold, waarna de inhoud werd gecentrifugeerd en de vermindering in caseïne in de oplossing bepaald, waaruit dus kon worden berekend hoeveel caseïne aan het  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  was gebonden. Dit bedroeg resp. 890, 790, 560, 240, 120 en 20 mg.

Uit de fosphaatvrije oplossing is 20 mg neergeslagen. Deze caseïne is of aan het  $\text{CaCO}_3$  gebonden of door het centrifugaalveld verwijderd; op de gegeven cijfers moet dus een correctie worden toegepast door deze alle met 20 mg te verminderen.

Wij hebben dus:

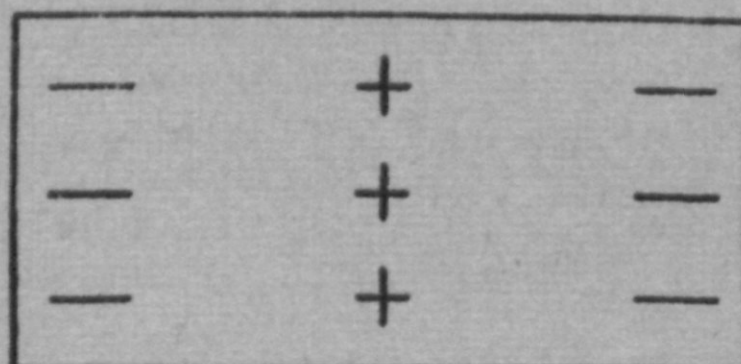


$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (m)	Geadsorbeerd (x)	Geadsorb. p. g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (x/m)	log. x m	Evenwichtscon- centratie (c)	log. c.
10	870	87	1,94	40	1,60
5	770	154	2,19	140	2,15
2,5	540	216	2,33	370	2,57
1,0	220	220	2,34	690	2,84
0,5	100	200	2,30	310	2,91



Bijgaande grafiek laat zien, dat bij 2,5 gram  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  blijkbaar verzadiging optreedt voor de bij deze proef gebruikte hoeveelheid fosphaat. Het eerste gedeelte verloopt rechtlijnig, zoodat wij vrij zeker met adsorptie te doen hebben.

Wij moeten ons een molecule  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in de ruimte opgebouwd denken uit 2 tetraëders  $\text{PO}_4$  met de groote zuurstofatomen in de hoekpunten en het kleine P-atoom in het zwaartepunt. De drie reactieve zuurstofatomen zullen naar elkaar toegekeerd zijn, met daartusschen de drie calciumatomen. Wij kunnen het molecule dan aldus voorstellen:





Wanneer wij nu bedenken, dat de caseïne met zijn negatieve carboxyl- en fosphaat- en positieve aminogroepen ook een dergelijk plus- en minpatroon heeft, wordt het duidelijk, dat het triphosphaat door de caseïne zal worden gebonden en zelfs in staat is vele caseïne-moleculen aan elkaar te hechten.

Wanneer men aan het systeem calciumcaseïnaat +  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  opgeloste zouten toevoegt, moet dit tot gevolg hebben, dat de adsorptie minder wordt, doordat de reactieve groepen der caseïne hierdoor worden verminderd.

Bij daling van de pH zal het aantal groepen groter worden en dus aanleiding geven tot vermeerderde adsorptie, omgekeerd zal een stijging der pH een vermindering moeten doen zien.

Toevoeging van formaldehyde zal een gedeelte der groepen, n.l. de aminogroepen, afschermen, zoodat ook hierdoor een vermindering in adsorptie teweeg moet worden gebracht.

#### Invloed van zouttoevoegingen.

Aan een calciumcaseïnaatoplossing werden KCl, NaCl en LiCl toegevoegd, zoodat de oplossingen 1 molair waren. De concentraties van de caseïne werden in gewichtsprocenten berekend, om de volumeverandering te corrigeeren.

Per 75 cm<sup>3</sup> oplossing werd nu toegevoegd 200, 500 en 1000 mg  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  p.a. en 100 mg  $\text{CaCO}_3$ ; na 3 uur rollen op de rollen-bok bij 25° C werden de concentraties weer bepaald na centrifugeering.

Toegevoegd $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ mg	Geadsorbeerd per gram $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$			
	geen zout	1m. KCl	1m. NaCl	1m. LiCl
200	330	270	280	—
500	270	240	230	240
1000	240	220	—	—

Wij zien dus een vermindering in caseïne-adsorptie door toegevoegd zout.

#### Invloed van de pH.

In verband met de oplosbaarheid van calciumphosphaat en caseïne in zuur milieu moeten wij ons bij de bestudeering der pH invloed beperken tot het alkalisch milieu.

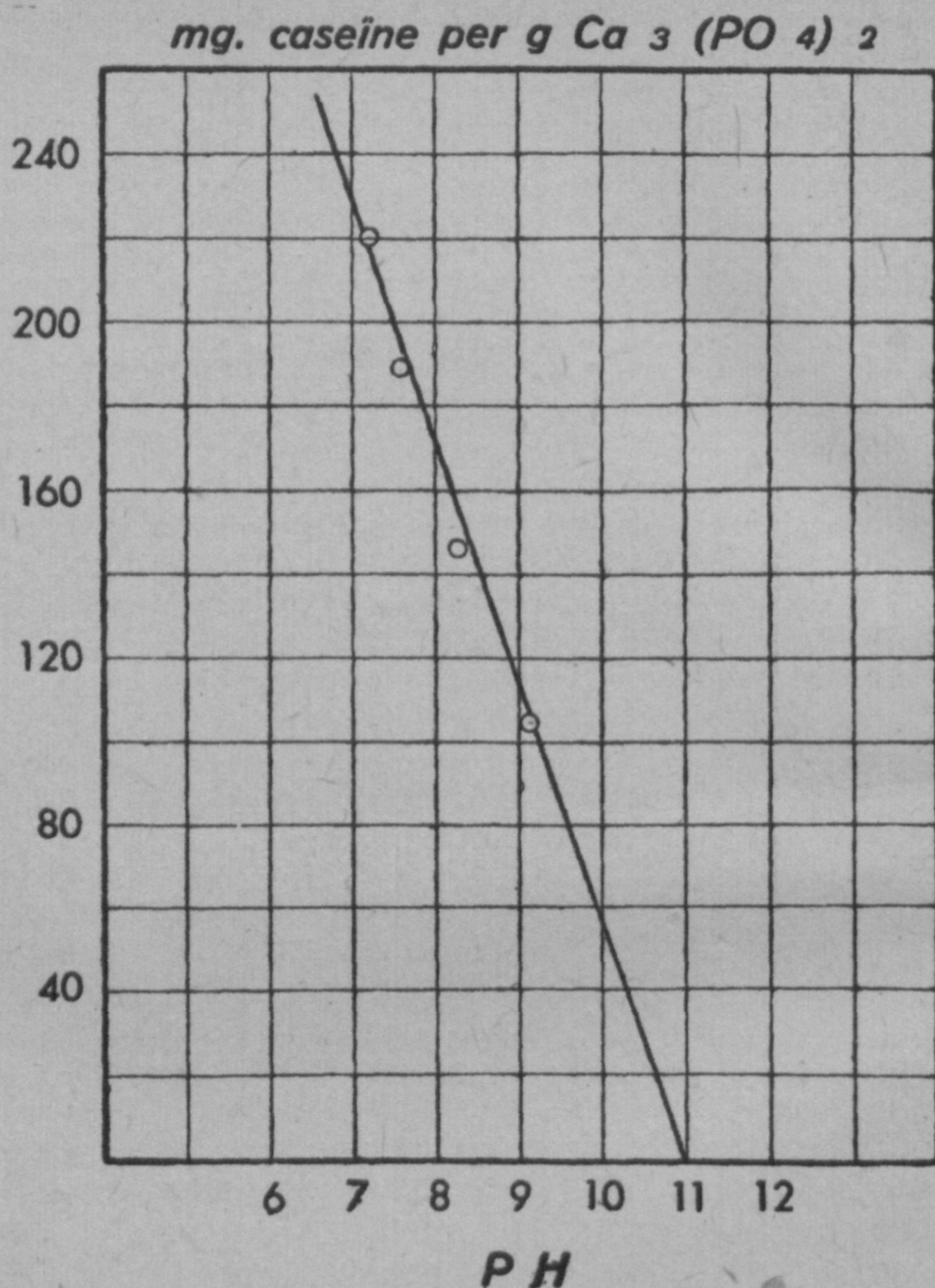
Aan 100 cm<sup>3</sup> calciumcaseïnaatoplossing werden 0, 1, 2 en 3 cm<sup>3</sup> 0,1N-NaOH toegevoegd en 1 g  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

De caseïne-concentraties werden weer in gewichtspercentages uitgerekend, zoodat de verdunning door de loog werd gecorrigeerd.

cm <sup>3</sup> 0,1N-NaOH	pH	geadsorbeerd per gram $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
0 cm <sup>3</sup>	7,11	220
1 cm <sup>3</sup>	7,56	188
2 cm <sup>3</sup>	8,35	146
3 cm <sup>3</sup>	9,19	105

Wanneer wij de pH tegen het geadsorbeerde grafisch uitzetten, blijkt er een rechte evenredigheid te bestaan. Bij pH 11 zou er niets meer worden geadsorbeerd.  
gecorrigeerd:





#### **Formaline-toevoeging.**

Door de verbinding, die formaline met de aminogroepen aangaat, wordt de lading van het caseïnemolecuul verminderd. Zoo dus deze groepen een rol spelen bij de besproken adsorptie, zal dit een minder goede binding van de caseïne aan het triphosphaat tengevolge moeten hebben.

Wij zagen echter tevens, dat de formalinetoevoeging aan caseïne een daling in pH met zich medebrengt en daar hiervóór onder no. 4 is gebleken, dat een daling in pH een verhoogde adsorptie tengevolge heeft, moeten wij dus de pH corrigeeren na het toevoegen der formaline. Naast een adsorptieproef zonder formaline, werden er twee gedaan met formaline, waarbij echter in het eene geval de formaline werd toegevoegd voordat het triphosphaat werd bijgevoegd, in het andere geval nadat het triphosphaat met de caseïne-oplossing op de rollenbok was gerold. Wij hebben de volgende proeven.

1. aan 125 cm<sup>3</sup> 0,93 % calciumcaseïnaat-oplossing werden toegevoegd: 10 cm<sup>3</sup> aq. dest., 5 gram  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  en 200 mg krijt. De pH van het geheel was 6,5. Dit werd 3 uur op de rollenbok bij 25° C. gerold, waarna de geadsorbeerde hoeveelheid caseïne aan het triphosphaat werd bepaald.
2. dezelfde toevoegingen als onder 1, doch in plaats van 10 cm<sup>3</sup> water werd toegevoegd 10 cm<sup>3</sup> geneutraliseerde formaline-oplossing. Daar hierdoor de pH daalt, werd deze met een weinig loog op dezelfde pH 6,5 gebracht als onder 1. Hierna



werd bij 25 °C 3 uren op de rollenbok gerold en de geadsorbeerde hoeveelheid caseïne bepaald.

3. Aan 125 cm<sup>3</sup> der oplossing werd eerst 10 cm<sup>3</sup> geneutraliseerde formaline toegevoegd en de pH gecorrigeerd. Zoo werd 3 uren op de rollenbok gerold, waarna het Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> en het krijt werden toegevoegd. Nu werd weer 3 uren bij 25 °C gerold en de caseïnevermindering in de oplossing bepaald.

De resultaten waren:

	mg geadsorbeerde caseïne per g Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
1)	158 mg
2)	162 mg
3)	80 mg

Toevoeging van formaline voor de fosphaattoevoeging doet de adsorptie dus sterk afnemen.

Uit de tweede proef blijkt tevens, dat indien de caseïne eenmaal is gebonden, ze niet is te verdringen door de inwerking van formaline.

Een eigenaardigheid dient hier nog vermeld te worden.

Een normale adsorptie heeft momentaan plaats, doch bij de binding van caseïne aan het Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> gaat dit door met de tijd, zooals uit de volgende cijfers blijkt.

75 cm<sup>3</sup> calciumcaseïnaatoplossing (0,94 %) met 5 gram Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> en 200 mg CaCO<sub>3</sub> werden gedurende 5, 15, 60 en 180 minuten gerold en na deze tijden bedroeg de adsorptie der caseïne per gram Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> resp. 170, 182, 209 en 240 mg.

Een verklaring hiervoor kon niet worden gevonden. Het zou misschien kunnen zijn, dat een geleidelijke verandering optreedt door denaturatie der eiwitfilm (Devaux (56); Metcalf (57)).

Men kan zich afvragen of dat, wat bij de caseïnatoren gebeurt, ook in de melk zal geschieden met het calciumcaseïnaatcalciumfosphaatcomplex:

50 cm<sup>3</sup> melk + 85 aq. dest. + 5 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> + 200 mg CaCO<sub>3</sub> pH 6,5 werd 3 uur op de rollenbok gerold. Voor en na centrifugeering waren de gehalten:

	Eiwitconcentraties		mg geadsorbeerd per g Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
	beginconcentr.	eindconcentr.	
totaal	1,29	0,59	195
caseïne	1,02	0,38	178
albumine	0,15	0,09	17
Rest-N	0,12	0,12	0

De albumine blijkt dus ook aan het triphosfaat te worden gebonden.

### Discussie der resultaten.

Uit de in dit hoofdstuk vermelde proeven blijkt, dat calciumtriphosfaat pro analyse, gebracht in een oplossing van calciumcaseïnaat, dat caseïnaat op zich adsorbeert. Deze adsorptie wordt ook vastgesteld in melk aan het calciumcaseïnaatcalciumfosphaatcomplex. Het omgekeerde zal dus ook plaats hebben, d.w.z. dat deeltjes van het complex, zooals ze in melk voorkomen, uiterst kleine deeltjes precipiteerend of geprecipiteerd Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> op zich binden.

Onder 4 blijkt, dat toegevoegde loog de adsorptie doet afnemen en daar in een calciumcaseïnaatoplossing bij pH 7 reeds alle ester PO<sub>4</sub> groepen met Ca zijn bezet, zooals in hoofdstuk III



is uiteengezet, heeft dus de toevoeging van loog een dicht-drukken der negatieve carboxylgroepen bewerkstelligd. Door formaline werd de adsorptie verminderd door de afscherming der positieve aminogroepen. De adsorptie zal dus plaats hebben aan de carboxyl- en aminogroepen der caseïne. Dit nu acht ik belangrijk, zoo wij ons in herinnering brengen wat bij de bespreking over de vermeerderde formoltitratie bij verhitting van melk is gezegd. Wij zagen, dat de titratie volgens Sørensen in wezen niets anders kan zijn dan een min of meer nauwkeurig lysinebepaling. Daar na verhitting van melk blijkb. meer van deze epsilon-aminogroepen der lysine worden bepaald, moeten deze dus op de een of andere wijze voor de formalinewerking zijn vrijgekomen.

Wij zien nu uit de adsorptieproef met  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , dat formaline niet in staat is dit fosphaat van zijn bindingsplaats aan de aminogroepen te verdringen. In de loop van dit onderzoek werd aannemelijk gemaakt, dat door verwarming van melk Ca en  $\text{PO}_4$  van het caseïnaatcomplex worden afgesplitst.

Het ligt dus voor de hand, dat de vermeerderde formoltitratie na verwarming een gevolg zal zijn van de afsplitsing van negatieve fosphaationen van de positieve aminogroepen. Wij komen dus zoo tot de conclusie, dat de vrije aminogroepen, althans de epsilon-groepen van lysine, 'n rol spelen bij de binding van het calciumfosphaat aan caseïne. De dubbelverbinding aan de carboxylgroepen volgens de voorstellingen van Eilers (18) of aan de esterfosphaatgroep volgens De Kadt (25) komt hierdoor dus te vervallen.



## HOOFDSTUK VIII.

### Oxalaat-titratie volgens Ling met verhitte melk.

Ik meende door deze titraties, welker methodiek reeds in Hoofdstuk III is besproken, meer inzicht in de omzettingen bij verwarming van melk te kunnen krijgen, daar wij hierdoor in staat worden gesteld te bepalen: het aan caseïne gebonden  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , de caseïnecalcium, de caseïnezuurtegraad enz.

Door melk, met en zonder gist verwarmd, te vergelijken met rauwe melk, werd verwacht, dat het hierdoor verkregen cijfermateriaal meer inzicht zou verschaffen in de omzettingen, die hiervóór reeds ter sprake kwamen.

Ling titreerde melk en lebwei tegen phenolphthaleïne als indicator. Bij hoog verwarmde melk doet zich nu de moeilijkheid voor, dat het omslagpunt in de eenigszins bruin geworden melk niet duidelijk is.

Ten tweede is het niet mogelijk verwarmde melk met leb te stremmen, zoodat het serum op andere wijze moet worden verkregen. Er werd nu besloten de titraties potentiometrisch uit te voeren en de wei te bereiden door centrifugeering van de melk met de supercentrifuge. In deze door centrifugeeren verkregen wei blijft steeds een weinig caseïne achter, waarvoor wij dus een correctie moeten invoeren.

#### Oriënteerende proef.

Van een monster melk met een gehalte aan caseïne van 2,56 % werd de helft gecentrifugeerd met de Sharples, waardoor een wei resulteerde met 0,27 % caseïne.

Van de melk ( $M_1$ ) en de wei ( $W_1$ ) werden nu titratiecurven bepaald. Deze werden ook bepaald na oxalaattoevoeging (4 % van een verzadigde kaliumoxalaatoplossing), hetgeen  $M_2$  en  $W_2$  oplevert.

Getitreerd werd entelkens 150 cm<sup>3</sup> met 0,1 n NaOH:

pH	$M_1$	$M_2$	$W_1$	$W_2$	$(M_1 - M_2) - (W_1 - W_2) = \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
8,2	24,0	8,0	17,1	11,6	10,5
8,4	25,8	9,0	18,2	12,1	10,7
8,6	27,6	9,8	19,4	12,5	10,9
8,8	29,4	10,6	20,6	13,1	11,3
9,0	31,3	11,7	21,8	13,8	11,6
9,2	33,5	14,0	23,1	14,7	11,1

Bij pH 9 vinden wij dus de hoogste waarde voor de hoeveelheid loog corresponderende met het triphosfaat. Daar wij de waarde voor 100 gram melk moeten berekenen, hebben wij een correctie toe te passen voor de onttrokken caseïne en het S. G., terwijl nog een correctie van 11 % moet worden toegepast voor de in de wei achtergebleven caseïne (0,27 % tegen de oorspronkelijke 2,56 %). Wij komen zoo op 13,1 cm<sup>3</sup> 0,1N NaOH per 150 cm<sup>3</sup> melk, hetgeen omgerekend op  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  wordt  $(13,1 \times 155) : 150 = 135$  mg, corresponderende met 2,56 gram caseïne, dus per gram caseïne met 53 mg.

Dit komt dus vrij goed overeen met de cijfers van Ling (24) en met die van De Kadt. (25).

De titratiewaarden werden in de nu volgende proef electro-metrisch bij pH 9 bepaald.



### Titratie van melk met en zonder gist verhit.

Van een monster melk werd de helft zonder gisten, de andere helft met gisten aan de volgende behandeling onderworpen. De rauwe melk werd geanalyseerd op caseïne (2,76 %), totale Ca (0,124 %) en totale  $\text{PO}_4$  (0,286 %).

De melk werd gedeeltelijk met de Sharples gecentrifugeerd en de verkregen wei, zooals in hoofdstuk IV vermeld, geanalyseerd op calcium, fosphaat en caseïne. Uit dit laatste kan dus de uitgeslingerde caseïne worden berekend.

Titraties werden uitgevoerd van melk ( $M_1$ ), van melk met oxalaat ( $M_2$ ), van de bijbehorende wei ( $W_1$ ) en van de wei met oxalaat ( $W_2$ ), waaruit dus het gehalte aan  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  kan worden berekend.

De melk werd 20 min. op  $110^\circ\text{C}$  resp.  $120^\circ\text{C}$  verhit en na afkoeling werden dezelfde bepalingen gedaan.

De melk met gisten werd 20 min. op  $100^\circ$ ,  $110^\circ$  en  $120^\circ\text{C}$  verhit en na afkoeling werden de gisten door 5 minuten centrifugeeren met 4000 r/m met het daarop gebonden  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  verwijderd. Van de resulterende melk werd het gehalte aan kalk en fosphaat bepaald en verder werd hiermede precies gelijk gehandeld als met de vorengenoemde monsters melk.

De hier volgende cijfers zijn alle herleid voor 100 gram melk.

	$M_1$	$M_2$	$W_1$	$W_2$	c	o	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Wei		
								Ca	$\text{PO}_4$	cas.
a) rauw	20,73	7,43	14,05	9,27	6,68	4,78	132	0,046	0,139	0,29
b) $110^\circ\text{C}$ .	22,45	9,13	14,00	10,15	8,45	3,85	147	0,039	0,124	0,07
c) $120^\circ\text{C}$ .	24,93	11,13	16,98	13,09	7,75	3,89	151	0,043	0,131	0,46
met gist										
d) $100^\circ\text{C}$ .	24,38	12,43	15,57	11,17	8,80	4,40	117	0,042	0,138	0,0
e) $110^\circ\text{C}$ .	25,80	16,80	17,90	13,69	7,90	4,21	74	0,044	0,140	0,39
f) $120^\circ\text{C}$ .	28,15	24,10	23,52	19,75	4,63	3,77	8	0,051	0,149	1,51

c = caseïne-zuurtegraad of  $M_1 - W_1$

o = overrun of  $W_1 - W_2$

$$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 = (M_1 - M_2) - (W_1 - W_2).$$

Wanneer wij de totale kalk der melk verminderen met de kalk in de wei, en het triphosphaatcalcium, verkrijgen wij het gehalte aan caseïne calcium van het sediment. Evenzoo wordt het ester- $\text{PO}_4$  in het sediment berekend.

a)	Ca	in sediment	=	124	—	46	—	51	=	27	mg
	PO <sub>4</sub>	„	=	286	—	139	—	81	=	66	mg
b)	Ca	„	=	124	—	39	—	57	=	28	mg
	PO <sub>4</sub>	„	=	286	—	124	—	90	=	72	mg
c)	Ca	„	=	124	—	43	—	58 <sup>1/2</sup>	=	29 <sup>1/2</sup>	mg
	PO <sub>4</sub>	„	=	286	—	131	—	92 <sup>1/2</sup>	=	62 <sup>1/2</sup>	mg
met gist											
d)	Ca	„	=	126	—	42	—	45	=	29	mg
	PO <sub>4</sub>	„	=	279	—	138	—	72	=	69	mg
e)	Ca	„	=	90	—	44	—	29	=	17	mg
	PO <sub>4</sub>	„	=	237	—	140	—	45	=	52	mg
f)	Ca	„	=	55	—	51	—	3	=	1	mg
	PO <sub>4</sub>	„	=	180	—	149	—	5	=	26	mg

Daar wij nu de caseïne in het sediment kunnen berekenen uit de caseïne in de melk, verminderd met de caseïne der bijbe-



hoorende wei, zijn wij in staat de hoeveelheden Ca en  $\text{PO}_4$  te berekenen per gram caseïne, die buiten het colloïdale  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  aan de caseïne zijn gehouden.

Caseïne in het sediment	mg gebonden per g caseïne			Caseïne zuurtegraad Per g caseïne
	Cas. Ca	Ester- $\text{PO}_4$	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	
a) 2,47	10,9	26,6	53	2,7
b) 2,69	10,8	26,7	54	3,1
c) 2,30	10,0	27,0	66	3,4
met gist				
d) 2,76	10,5	25,0	42	3,2
e) 2,37	7,2	22,0	31	3,3
f) 1,25	1,8	21,0	3	3,7

#### Discussie der verkregen resultaten.

Zooals wij van tevoren uit het reeds besprokene verwachtten, zien wij bij de melk zonder gisten een toeneming van het colloïdale triphosfaat en een sterke vermindering bij de melk met gisten.

De vermindering van het caseïne calcium bewijst, dat ook dit calcium aan de reactie deelneemt, d. w. z. dat ook hieruit, met behulp der wei- $\text{PO}_4$ , neergeslagen  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  wordt gevormd. Bij melk met gisten heeft dit veel sterker plaats, waaruit dus te concludeeren valt, dat de snelheid van de omzetting bij de melk met gisten veel grooter is.

Dit bevestigt dus de veronderstelling in hoofdstuk V en VI gebaseerd op voorverwarming der melk, dat het procédé der omzetting van Ca en  $\text{PO}_4$  van het complex via de continue phase in melk zonder gisten minder snel moest verlopen, dan wanneer er gisten in het systeem aanwezig zijn.

Bij d zien wij dat reeds  $(53-42)/(53 \times 100) = 21\%$  van het triphosfaat is verdwenen, zonder dat nog het caseïne calcium is aangetast.

Dit is analoog met de resultaten, verkregen door Ling (23), die bij toevoeging van zuur vond, dat eerst het triphosfaat en later pas het caseïne calcium werd afgesplitst.

Dit caseïne calcium zal dus hechter gebonden moeten zijn dan het calcium van het triphosfaat. Dit nu is niet te verklaren uit de dubbelverbinding, zooals Pyne (18), De Kadt (25) of Eilers (58) die willen voorstellen.

In beide gevallen daalt de overrun (o) wat te begrijpen valt, daar bij verwarming  $\text{CaHPO}_4$  overgaat in triphosfaat en phosphorzuur. Door dit phosphorzuur zal de aciditeit van het serum stijgen. Verhoging van de aciditeit van het serum ontstaat bij verhitting ook door de zuurvorming uit lactose, zooals werd bewezen door Whittier & Benton (59) en Wolf & Bernhauer (60).

De caseïne zuurtegraad stijgt, of nu het gevormde  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  aan de caseïne wordt gebonden of dat het met de gisten wordt verwijderd. Whittier & Brenton (59) constateerden deze stijging van de caseïne zuurtegraad ook en verklaarden deze door aan te nemen, dat de uit de lactose gevormde zuren gedeeltelijk door de caseïne werden geabsorbeerd, terwijl Kometiani (20) het wil verklaren door het vrijkomen van carboxylgroepen der caseïne, door de afsplitsing van calciumphosfaat ten gevolge van de verhitting.

In hoofdstuk III werd uiteengezet dat Kometiani geen meerderde carboxylgroepen heeft kunnen vinden door afsplitsing van calciumphosfaat van de zure groepen der caseïne. De meest plausibele verklaring wil mij dan ook de adsorptie van de door de verwarming gevormde zuren aan caseïne voorkomen.



## HOOFDSTUK IX

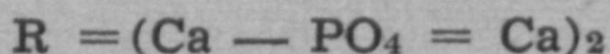
### Werkhypothese.

Wanneer wij na deze in de vorige hoofdstukken beschreven gegevens, een schema der binding van het calciumphosphaat aan de caseïne in melk willen opstellen, dan moeten wij het volgende in het oog houden.

1. Pyne (14) komt door zijn vergelijkende proeven van het melkcomplex met het door gelatine in oplossing gehouden  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  tot de conclusie, dat het calciumphosphaat in de melk niet als kristallijn  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  voorkomt.
2. Eilers (58) constateert door vergelijkende röntgendiagrammen, dat geen kristallijn  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in rauwe melk aanwezig is.
3. Door onze proeven met gist wordt aangetoond, dat door verwarming van melk de vorm, waarin het colloïdale fosphaat voorkomt, een verandering ondergaat en wel gaat het over in geprecipiteerd  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Door de proeven wordt aangetoond, dat het complex nu andere eigenschappen heeft verkregen, zoodat het oorspronkelijk niet in dien vorm aanwezig heeft kunnen zijn.

Uit deze 3 gegevens blijkt, dat het colloïdale fosphaat niet als  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  door het calciumcaseïnaat in oplossing wordt gehouden.

Verschillende auteurs komen, om die verbinding nu te verklaren, tot de opvatting van een calciumcaseïnaat-calciumphosphaat-additie-verbinding, waarbij enerzijds deze binding aan de carboxylgroepen wordt gehecht (Pyne, Eilers) anderzijds aan de in de caseïne veresterde fosphaatgroep (De Kadt):



Hiertegen moeten de volgende bezwaren worden ingebracht.

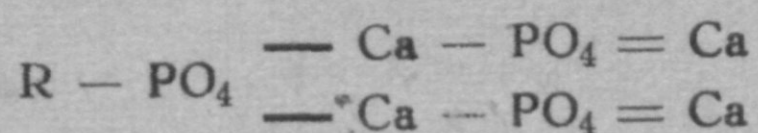
- a. Bij deze formule kan de verhouding triphosphaatcalcium: caseïne calcium niet groter worden dan 3 : 1. Ling vindt echter bij een groot aantal bepalingen van deze grootheden in 10 % der gevallen een grotere waarde voor deze verhouding.
- b. Bij aanzuring van melk vindt Ling, dat eerst triphosphaat, later pas caseïne calcium wordt afgesplitst.
- c. Analooq aan geval b wordt bij de eigen proeven geconstateerd, dat bij verhitting der melk eerst triphosphaat, later pas caseïne calcium wordt afgesplitst.

Hieruit blijkt, dat het caseïne calcium hechter zal zijn gebonden dan het triphosphaatcalcium. Als aanhechtingsplaatsen voor het Ca hebben wij in de caseïne de carboxylgroepen en de esterphosphaatgroepen. Gezien het feit, dat de fosphaatgroep veel sterker polariseerbaar is dan de carboxylgroep en het feit, dat het Ca-ion sterk polariseerend werkt, zal het caseïne calcium aan de esterphosphaatgroep zijn gehecht.

Bij een gehalte van 2,5 % esterphosphaat zal de caseïne dus  $25/95 \times 40 = 10,5$  mg Ca per gram caseïne bevatten. Zooals in hoofdstuk III is vermeld, blijkt uit de onderzoekingen langs chemischen weg van meerdere auteurs, dat gemiddeld 10,4 mg werd gevonden, wat dus, met het zoeven genoemde gehalte, een zeer goed overeenstemmende waarde mag worden genoemd.



Wanneer de additieverbinding nu aan de fosphaatgroep is gehecht, zooals De Kadt zich deze dacht:



dan zou het nog mogelijk zijn, dat door het verschil in sterkte-exponent tusschen de primaire en de secundaire fosphaat-groep een der beide, direct aan het esterfosphaat gehechte calciumatomen sterker zou zijn gebonden dan de andere, waar-door de geconstateerde verschillen zouden kunnen worden verklaard.

Wij hebben nu echter nog het feit van de vermeerdering in waarde der titratie vlgs. Sørensen bij oxalaattoevoegingen en na verwarming. Uitvoerig werd in hoofdstuk III uiteengezet, dat deze vermeerdering slechts het vrijkomen van epsilon-aminogroepen van lysine als oorzaak kan hebben.

In beide gevallen wordt het calciumfosphaat van het caseïne-complex afgesplitst, zoodat op een of andere wijze die amino-groepen in de fosphaatbinding moeten zijn betrokken.

Wij kunnen dit nog op een andere wijze duidelijk maken, n.l. door de melk spontaan te laten verzuren en tijdens deze ver-zuring de titratie vlgs. Sørensen toe te passen.

Door het zuur worden immers wordt zoowel het Ca als het fosphaat van de caseïne verwijderd en dit moet zich dan in de formoltitratie zoodanig uiten, dat er een steeds grooter aan-tal aminogroepen van lysine worden getitreerd. Een monster taptemelk werd hiertoe gedurende 30 minuten bij 60° C ge-pasteuriseerd, tot kamertemperatuur afgekoeld en met een weinig zuursel geënt. Bij kamertemperatuur werd nu de melk verzuurd tot schifting optrad. Af en toe werd de formol-titratie uitgevoerd:

Formoltitratie in cm<sup>3</sup> 1/10 N-NaOH, noodig voor 100 cm<sup>3</sup> melk

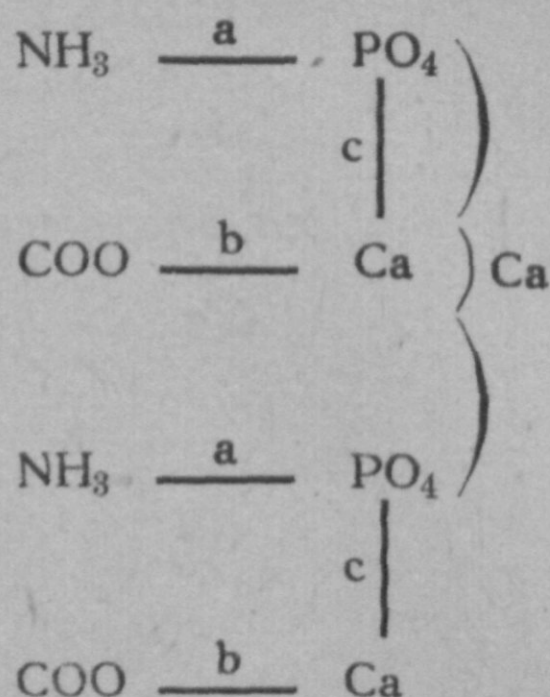
Zuurtegraad in cm <sup>3</sup> 1/10 n NaOH	Formoltitratie vlgs. Sørensen in cm <sup>3</sup> 1/10 n NaOH	% toenaming formoltitratie
direct 16,9	18,2	—
18,6	18,6	2,2
19,1	19,1	4,9
20,4	19,4	6,6
20,9	19,6	7,7
27,8	20,2	11,0
32,0	20,2	11,0
schifting		

Wij zien dus, dat de aminogroepen duidelijk met de zuurte-graad toenemen tot de betreffende melk ongeveer een zuurte-graad heeft van 27,8 cm<sup>3</sup> 1/10 n loog per 100 cm<sup>3</sup> melk. Hierna neemt de formoltitratie niet meer toe, zoodat bij de genoemde zuurtegraad blijkbaar alle fosphaat van de caseïne is af-gesplitst.

Daar de negatieve esterfosphaatgroepen verzadigd zijn met calcium als caseïne calcium, blijven er voor de binding van het triphosphaat dus negatieve carboxyl- en positieve aminogroepen over en daar de vorm Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> werd uitgesloten voor rauwe melk, komen wij tot de conclusie, dat Ca aan de carboxyl-, PO<sub>4</sub> aan de aminogroepen moet zijn gehecht.



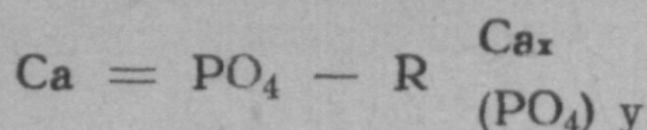
Dit zou als tricomplexsysteem aldus kunnen plaats hebben:



De affiniteiten a en b moeten hiervoor echter groot zijn en c klein en dit is hierbij niet het geval, daar c veel groter is dan a en b. De omstandigheden voor een tricomplexbinding zijn dus zeer ongunstig.

Ik kom dus tot de slotsom, dat het Ca en  $\text{PO}_4$  afzonderlijk aan de carboxyl- en aminogroepen zijn gehecht.

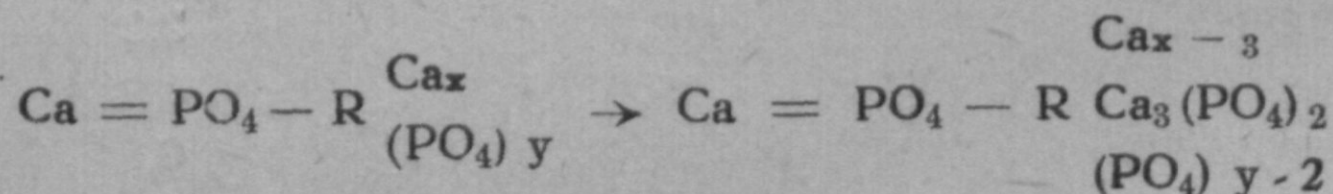
Het zou wel zeer toevallig zijn, wanneer dit juist zoo geschiedde dat de mol. verhouding  $\text{Ca}/\text{PO}_4$  precies 1,5 was. Volgens de onderzoeken van De Kadt en die van Van Slyke is dat echter ook niet het geval, daar bij dit groote cijfermateriaal die verhouding varieert van 1,20—1,90 met als gemiddelde ongeveer 1,5. Het symbool wordt dan:



waarin x en y zoodanig varieeren, dat de mol. verhouding x/y ongeveer 1,5 is.

Bij verwarming van melk gaat dit fosphaat via het in serum opgeloste Ca en  $\text{PO}_4$  over in neergeslagen  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  wat weer aan de caseïne wordt geadsorbeerd.

Al naar mate langer wordt verwarmd of hoger wordt verhit, wordt meer als  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  aan de caseïne geadsorbeerd en blijft er minder van x en y over:



**Eenige waarnemingen mij melk, gezien in het licht van het ontworpen schema.**

### 1. Lichtverstrooiing in melk.

De oorzaak der lichtverstrooiing in ondermelk werd vroeger meestal toegeschreven aan de er in aanwezige anorganische zouten, in casu het calciumfosphaat.

De supercentrifugegelei der melk is echter doorzichtig, terwijl zoo'n gelei nog ongeveer 60 % water bevat. De oorzaak van de troebeling is dus niet het colloïdale triphosphaat.

Wordt deze gelei weer in water gesuspenderd, dan krijgt men weer het melkige uiterlijk terug (25).

Hieruit volgt, zegt Eilers (58), dat de lichtverstrooiing, die aanleiding tot dit uiterlijk is, moet plaats vinden bij de overgang van het licht van de continue waterphase naar de geleiachtige calciumcaseïnaatphosphaatphase, die een duidelijk hiervan afwijkende brekingsindex moet bezitten. Hij bepaalde van de gelei de brekingsindex en vond 1,40 à 1,42, hetgeen een zeer



duidelijk verschil vertoont met de brekingsindex der centrifugewei:  $n_D^{15} = 1,3437$  of van gedestilleerd water 1,333.

Het melkachtige uiterlijk van ondermelk moet dus worden toegeschreven aan lichtverstrooiing aan het oppervlak der grovere deeltjes der calciumcaseïnaatphosphaatgelei en niet aan de aanwezigheid van tricalciumphosphaatdeeltjes.

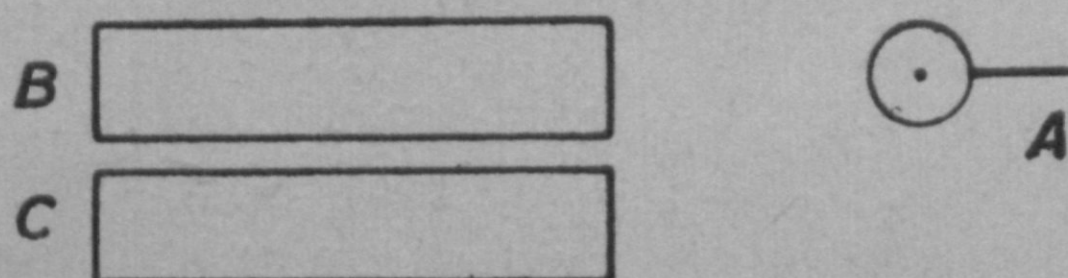
Volgens de werkhypothese kunnen aan de carboxylgroepen gehechte tweewaardige calciumatomen twee caseïnaatmoleculen aan elkaar hechten. Op deze wijze kunnen grotere deeltjes ontstaan.

Wanneer dus die atomen op de een of andere wijze aan de deeltjes worden onttrokken, moet dit een kleiner worden der partikels bij gelijkblijvende pH tengevolge hebben.

Omgekeerd, wanneer er calciumatomen in de deeltjes worden opgenomen, zal dit een vergroting met zich brengen.

Nu brengt het meten dezer deeltjes groote moeilijkheden met zich mee: wel echter kunnen wij de relatieve grootte t. o. v. de oorspronkelijke melk door middel van verstrooid licht van de Tyndall-kegel bepalen.

Dit geschiedde met een opstelling, waarvan de horizontale doorsnede schematisch aldus was:



A is een laagspanningsgloeilampje met verticale rechte draad, dat op een 6 volts auto-accu brandt.

Het licht valt op de Leyboldt-cuvette B, welke de te onderzoeken vloeistof bevat. De inwendige afmetingen van de cuvette zijn 40 mm breed, 60 mm hoog en 10 mm dik.

Het verstrooide licht valt op een Weston-phototronic-cel C, die verbonden is aan een Moll-Galvanometer. De aflezing van de galvanometer is een maat van het verstrooide licht.

Verder zijn de noodige lichtafschermingen aangebracht om te voorkomen, dat valsch licht op de fotospanningscel valt. Op deze wijze is het mogelijk de metingen in diffuus daglicht uit te voeren.

Ter contrôle van het valsche licht wordt de cuvette zoo nu en dan met gedestilleerd water gevuld. De uitslag van de galvanometer bedraagt dan niet meer dan enkele procenten van de aflezing van het Tyndall-licht der te onderzoeken vloeistof en wordt als correctie afgetrokken.

Om de constantheid van de lichtsterkte van het lampje A en de gevoeligheid van de cel C te controleeren, wordt op de plaats van de cuvette zoo nu en dan een metalen wig geplaatst, die op de schuine kant met roet is zwart gemaakt. De geringe hoeveelheid licht, die dan nog op de fotocel wordt teruggekaatst, is van dezelfde orde als het Tyndall-licht der melkgekaatst, is van dezelfde orde als het Tyndall-licht der melkgeverdunding. Om het verloop van de lichtsterkte en van de gevoeligheid van de cel te elimineeren, wordt het meetresultaat steeds aangegeven als het quotient der aflezingen met de cuvette en de wig en tenslotte wordt dit quotient nog met een vaste factor vermenigvuldigd, zoodat de uitkomst van de onbehandelde melk op 100 uitkomt.

Is de uitkomst bij een behandelde melk groter of kleiner dan 100, dan kunnen wij veilig aannemen, dat dan ook de deeltjes groter, resp. kleiner zijn dan in de onbehandelde melk.

Een lineair verband tusschen de uitkomst met het apparaat verkregen en de deeltjesgrootte bestaat natuurlijk niet. Een bezwaar van de methode is, dat voor de meting de melk met



gedestilleerd water in de verhouding 1 : 200 moet worden verdund. Indien men onverdunde melk zou gebruiken, zou het verstrooide licht veel meer door de lichtabsorptie in de melk dan door de Tyndall-verstrooiing worden bepaald.

Wanneer nu door de gisten of door toevoeging van neutraal oxalaat kalk aan het complex wordt onttrokken, moeten de deeltjes kleiner worden. Bij verhitting van melk neemt het kalkgehalte der caseïnaatphase juist toe, zoodat wij een vergroting moeten constateeren.

Om de behandelde melk te kunnen vergelijken met onbehandelde, is het vanzelfsprekend noodzakelijk, dat na de behandeling eenzelfde percentage eiwit, dat de verstrooiing veroorzaakt, aanwezig is. Bij de behandeling met gist, oxalaat of citraat moet worden gecentrifugeerd om de eventueel neergeslagen kalk te verwijderen. Het zou kunnen zijn, dat hiermede tevens een weinig eiwit uit de melk verdween.

Dit werd nagegaan door aan 75 cm<sup>3</sup> melk 1,5 cm<sup>3</sup> van verschillende reagentia toe te voegen, waarna 15 minuten op 110° C werd verhit. Alle monsters werden nu 5 minuten gecentrifugeerd (4000r/m) en daarna werd in de bovenstaande vloeistof de N bepaald.

toevoeging	% eiwit in bovenstaande vloeistof
+ 1.5 cm <sup>3</sup> H <sub>2</sub> O	3,00
1,5 cm <sup>3</sup> K <sub>2</sub> ox. (verzadigd)	2.99
1,5 cm <sup>3</sup> Na <sub>3</sub> citraat (10 %)	2,99
1,5 cm <sup>3</sup> gist-suspensie	3,05

Het blijkt dus, dat eventueele veranderingen in de lichtverstrooiing zullen moeten liggen aan de deeltjesgrootte en niet aan verandering der eiwitconcentratie.

#### Verkleining der deeltjesgrootte.

##### K a l k o n t t r e k k i n g   d o o r   g i s t.

Aan een reeks kolfjes, ieder met 100 cm<sup>3</sup> melk, werden oplopende hoeveelheden gist toegevoegd, waarna even op 120° C werd verwarmd. Na afcentrifugeering der gisten werd de hierop gebonden kalk bepaald en van de overblijvende melk de lichtverstrooiing gemeten.

Bij deze proef ontbreekt de meting bij rauwe melk, zoodat in dit geval de uitkomst voor de verhitte melk zonder gisten op 100 is gesteld, wat trouwens aan de duidelijkheid der proef geen afbreuk doet.

g gist/100 cm <sup>3</sup> melk	relatieve grootte	mg onttrokken Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
0,0	100	—
0,30	77	85
0,60	17	133
1,00	15	145
1,50	10	176

Er is dus een duidelijke vermindering in deeltjesgrootte.

##### O n t t r e k k i n g   v a n   C a   d o o r n e u t r a a l   o x a l a a t.

K<sub>2</sub>-oxalaat werd in oplopende hoeveelheden aan melk toege-



voegd; hierna werd op 120°C verhit en afgecentrifugeerd en in de overblijvende melk de verstrooiing gemeten:

gram K <sub>2</sub> oxalaat/liter melk	relatieve grootte
geen	150
1,32 gram	123
1,76	90
2,20	33
2,60	31

De lichtverstrooiing der onverhitte melk was hier op 100 gesteld. Wij zien ook hier een vermindering in deeltjesgrootte. Ook natriumcitraat- en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-toevoegingen gaven deze verkleining der deeltjes te zien.

Eilers (58) constateerde iets dergelijks bij toevoeging van neutraal kaliumcitraat (8 deelen citraat + 1 deel citroenzuur), waarbij de opmerking werd gemaakt, dat misschien het brekingsindexverschil tusschen caseïnaatphase en continue phase afneemt. Dit zal echter in het geval der gisten zeer zeker niet het geval zijn.

#### Vergrooting der deeltjes.

Zooals reeds gezegd, moet verhitting van melk door de vermeerdering in triphosfaat in de caseïnephase tevens gepaard gaan met een vergrooting der deeltjes.

Daar wij zagen, dat de albumine in opgelosten toestand blijft, zal deze weinig invloed op de lichtverstrooiing kunnen uitoefenen:

	relatieve grootte			
	1	2	3	4
Melk (rauw)	100	100	100	100
100°	104	123	109	117
120°	130	175	138	136

Wij zien dus een duidelijke vergrooting.

Toevoeging van een weinig CaCl<sub>2</sub> heeft zeer sterk dit effect. Dat hierbij Ca aan de caseïne wordt gebonden, blijkt uit een onderzoek van Ballowitz (61), die geneutraliseerde CaCl<sub>2</sub> aan melk toevoegde en deze daarna verwarmde.

Door ultrafiltratie bleek, dat in het filtraat minder Ca aanwezig was dan er moest zijn, terwijl het fosfaat vrijwel op hetzelfde peil bleef.

De toevoegingen kunnen natuurlijk slechts zeer klein zijn, daar anders coagulatie optreedt; coagulatie is ook niets anders dan een steeds groter worden der deeltjes.

De vergrooting der deeltjes door de Ca-adsorptie wordt door de volgende proef, waarbij de melk even op 120°C werd verwarmd, nog eens duidelijk gedemonstreerd:

	relatieve grootte
Rauwe melk	100
op 120 °C verwarmd	135
+ 85 mg Ca/liter	141
+ 100 mg Ca/liter	160
+ 150 mg Ca/liter	gcoaguleerd

#### 2. Verandering bij matige verwarming.

Wij zagen, dat bij verwarming van melk met gisten de overdracht van Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> op de gisten met de temperatuur en de tijd toenam. Bij verwarming op temperaturen lager dan 80 °C kon in een uur tijds geen overdracht met zekerheid worden aangetoond. Een langere verwarming bij lagere temperatuur werd niet aangewend, daar hierdoor stellig veranderingen van



bacteriëlen aard in de melk zouden optreden en de proeven hierdoor hun waarde zouden verliezen.

De afsplitsing van Ca en  $\text{PO}_4$  van de caseïnaatphase moet echter bij matige verwarming der melk toch optreden, hoewel daarbij blijkbaar nog geen neerslaan van  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  optreedt.

De caseïnaatpartikeltjes moeten door de geringe afsplitsing echter kleiner worden, zij het dan ook slechts weinig.

Daar het triphosfaat echter niet neerslaat, moet bij afkoeling der melk een regressie optreden, n.l. het afgesplitste Ca en  $\text{PO}_4$  treden weer in de caseïnaatphase terug.

Wanneer dit het geval is, moet dit feit te constateeren zijn in de viscositeit der melk; immers, in het eerste geval worden de deeltjes, bij het gelijkblijven der eiwitconcentratie, kleiner, wat een daling in viscositeit tengevolge moet hebben. Als men daarna de melk koud laat staan, zal de grootte der deeltjes zich herstellen, zoodat de viscositeit weer moet toenemen.

Uit onderzoekingen van Whitaker, Sherman & Sharp (62) blijkt, dat de viscositeit bij verwarming van melk beneden  $70^\circ\text{C}$  afneemt en dat verwarming gedurende 30 minuten op  $55^\circ\text{C}$  een minimum in viscositeit bij melk ten gevolge heeft.

Taptemelk werd 5 minuten tot  $25^\circ$ ,  $40^\circ$  en  $60^\circ\text{C}$  verwarmd, waarna direct de viscositeit werd gemeten, na afkoeling op  $25^\circ\text{C}$ , met een viscosimeter vlgs. Ostwald. De viscosimeter werd te dien einde in een waterbad met een constante temperatuur van  $25^\circ\text{C} \pm 0,05$  opgesteld. De relatieve viscositeit werd gemeten t. o. v. water van  $25^\circ\text{C}$ .

Direct na de verwarming werden de monsters melk bij  $2^\circ\text{C}$  weggezet en na bepaalde tijden werd de viscositeit bij  $25^\circ\text{C}$  bepaald. De resultaten waren als volgt.

Voorbehandeling	direct	Doorlooptijd in seconden		
		na 3u.	na 5u.	na 24u.
geen	118,3			118,1
5' $25^\circ\text{C}$	118,1		118,3	118,6
5' $40^\circ\text{C}$	115,4	115,7	115,8	118,4
5' $60^\circ\text{C}$	110,2	111,3	111,3	113,6
water	74,1	74,2	74,0	

Wij zien dus een daling van de viscositeit door verwarming en een langzaam herstel van de oorspronkelijke waarde in de koude. Eilers constateerde ook deze viscositeitsverandering bij verwarming en weer afkoeling der melk en deed tevens deze metingen bij lebwei. Lebwei vertoonde deze regressie niet, waaruit moet worden geconcludeerd, dat de caseïnaatphase de oorzaak hiervan is. Tevens constateerde Eilers, dat hoe dieper de melk wordt gekoeld na de verwarming, hoe sneller het herstel van de oorspronkelijke viscositeit plaats heeft.

Boven  $60^\circ\text{C}$  heeft een snelle toeneming van de viscositeit plaats, welke volgens Eilers aan de denaturatie der eiwitten moet worden toegeschreven, welke stijging in viscositeit blijft bestaan na afkoeling. De na 24 uur gemeten viscositeit der monsters is ongeveer met het verschil tusschen de viscositeiten bij  $55^\circ\text{C}$  bij directe meting en na een dag toegenomen. Het is dus waarschijnlijk, dat die reversibele omzetting ook bij temperaturen boven  $60^\circ\text{C}$  plaats vindt. Eilers zoekt de verklaring hetzij in een reversibele verlaging der hoeveelheid water die een caseïnaatmicel bevat, hetzij in een opheffing eener eventuele aggregatie van afzonderlijke micellen dezer phase.

### 3. De stremtijd.

Zooals algemeen bekend is, reageert verhitte melk niet normaal met stremsel en alhoewel de processen, die zich bij de



inwerking van dit enzym afspelen, slechts weinig zijn opgehelderd, wordt algemeen aangenomen, dat het Ca hierbij een voorname rol speelt. Immers, men kan bij melk, die door verwarming niet of zeer langzaam stremt, de oorspronkelijke stremtijd herstellen, door het toevoegen van opgeloste kalk aan die melk.

De verminderde coaguleerbaarheid van gepasteuriseerde melk door stremsel wordt dan toegeschreven aan de precipitatie van het calcium, dat essentieel is voor die stremming.

Door de onderzoeken van Stassano & Talarico (28) blijkt echter een snellere stremming op te treden indien de melk verwarmd wordt op temperaturen beneden  $65^{\circ}\text{C}$ . verwarmen boven deze temperatuur heeft echter vertraging in de stremming tengevolge.

De onderzoeken van Rupp (29) zijn hiermede volledig in overeenstemming. Mattick & Hallet (30) constateeren eveneens deze snellere stremming na voorverwarming op lagere temperaturen ( $38\text{--}61^{\circ}\text{C}$ ) doch zij vinden tevens, dat de stremtijd weer langer wordt naarmate het interval tusschen de verwarming en de stremseltoevoeging groter wordt. Voorverwarming boven  $62^{\circ}\text{C}$  doet de stremtijd onmiddellijk toenemen. De toeneming in stremtijd wordt groter met de tijdsduur, die men laat verstrijken tusschen de verwarming en de stremseltoevoeging, terwijl een maximum wordt bereikt na 5 uur tusschenruimte.

Ling (24) gaat de invloed van het bewaren der melk in de koude ( $7^{\circ}\text{C}$ ) na. Hij vindt dat een langere stremtijd hiervan het gevolg is.

Powell & Palmer (27) constateeren ook deze hysteresis-effecten bij calciumcaseïnaat-calciumphosphaatcomplexen, bereid volgens Porcher, waarbij zij tevens vinden, dat zoo men het calciumcaseïnaat alleen verhit, deze gevolgen niet optreden, doch alleen wanneer dit te zamen met het fosphaat als complex wordt verwarmd. Verklaringen voor de waargenomen verschijnselen worden niet gegeven doch ik zou ze als volgt willen interpreteren.

Bij het verwarmen van melk worden Ca en  $\text{PO}_4$  van het caseïne-complex afgesplitst, zonder dat het bij temperaturen beneden  $60^{\circ}\text{C}$  nog tot precipitatie van  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  komt. Het verhoogde gehalte aan opgeloste kalk doet de stremtijd nu korter worden.

Wanneer een matig verwarmde melk nu koud wordt bewaard, zal het verstoorde evenwicht zich weer herstellen en keeren de kalk en het fosphaat weer in het complex terug, welk proces blijkbaar vrij langzaam verloopt. De vermindering aan opgeloste kalk doet de stremtijd nu weer langer worden.

Bij het bewaren van melk bij lagere temperaturen zal het evenwicht ook zonder voorverwarming nog verder worden verschoven ook al is die melk niet op matige temperatuur voorverwarmd.

Wij moeten ons hierbij in herinnering brengen, dat de melk is ingesteld op een evenwicht bij de lichaamstemperatuur van de koe, zoodat bij bewaring op lagere temperatuur kalk uit de oplossing in het complex zal moeten worden gebonden, met als gevolg een langere stremtijd.

Bij temperaturen boven  $62^{\circ}\text{C}$  slaat  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in het serum neer. Wij constateeren dan tevens een vermindering van de hoeveelheden opgeloste Ca en  $\text{PO}_4$ . De stremtijd wordt dus langer. Het neerslaan van tertiair fosphaat verloopt echter volgens Holt, La Mer & Chown (13) zeer langzaam en wanneer wij dergelijke melk in de koude wegzetten, zal dit neerslaan nog eenigen tijd doorgaan. De Ca-concentratie neemt dus langzamerhand meer af en de stremtijd zal langer worden.



#### 4. Veranderde oprooming.

Ik wil hier een punt, dat naar voren kwam bij een studie over oprooming, bespreken daar er een zekere overeenkomst met het besprokene uit blijkt, hoewel de interpretatie der geconstateerde feiten niet streng door mij kan worden geformuleerd.

Laat men volle rauwe melk rustig staan, dan heeft er oprooming plaats, waardoor een min of meer duidelijke roomlaag ontstaat.

De mate waarin dit geschiedt is verschillend en hangt af van diverse in- en uitwendige factoren.

Het is een in de zuivelbereiding bekend verschijnsel, dat melk, die langere tijd bij lage temperatuur is bewaard, na opnieuw dooreenmengen sterk in oproomvermogen is achteruitgegaan, doch dat deze door even opwarmen op temperaturen beneden  $60^{\circ}\text{C}$  weer wordt hersteld.

Van Dam & Sirks (95) meenen, dat de zooveel betere oprooming bij lage temperatuur van voorgewarmde melk, in vergelijking met de oprooming van dezelfde, van te voren lang en diep gekoelde, doch niet voorgewarmde melk, hieraan is toe te schrijven, dat in het eerste geval het melkvet tijdens de oprooming bezig is vast te worden, terwijl in het laatste geval het vet reeds in geheel vasten toestand verkeert.

Daar dit vast worden van het melkvet met een niet onbelangrijke productie van warmte door kristallisatie gepaard gaat, die plaatselijk voor een gemakkelijke opstijging der vetbolletjes van beteekenis zal zijn, werd het waarschijnlijk geacht, dat de betere oprooming der voorgewarmde melk aan de optredende kristallisiatiewarmte moet worden toegeschreven.

Orla Jensen (97) verklaart het verschijnsel door de veranderde dichtheid van de vetbolletjes bij stolling en smelten en spreekt van „Kälteschwere”.

Beide theorieën berusten dus op fysische eigenschappen van het melkvet en het lag voor de hand, dat men hierin de oorzaak zocht.

Bij een onderzoek over de oprooming bleek mij echter het volgende. Wanneer de vetbolletjes van het melkplasma worden gescheiden en room en ondermelk afzonderlijk aan koude en warmtebehandeling worden onderworpen dan blijkt, na hereeniging der beide bestanddeelen, de oorzaak niet bij het vet, doch bij het plasma te liggen, wat duidelijk blijkt uit de volgende proef.

Rauwe volle melk (3,8 % vet) werd gecentrifugeerd, waardoor tapte melk werd verkregen met 0,1 % vet. De room werd tweemaal uitgewasschen met gedestilleerd water, waardoor, zooals Jack & Dahle (96) aantoonen, het melkplasma bijna geheel uit de room wordt verwijderd, zonder dat de membraan der vetbolletjes wordt aangetast. Het vetpercentage der zoo behandelde „room” bedroeg 22 %. Nadat deze „room” en tapte melk nu 20 uur bij  $5^{\circ}\text{C}$  waren bewaard, werden na diverse voorbehandelingen der componenten, deze weer hereenigd, waarbij zorg werd gedragen dat de resulterende melken eenzelfde vetpercentage bevatten.

1. Room en taptemelk werden koud voorzichtig gemengd, zodat een melk met 3,8 % vet resulteerde (KM).
2. De room werd op  $40^{\circ}\text{C}$  gebracht, hierna afgekoeld en met de koude taptemelk gemengd tot 3,8 % vet (WR).
3. De taptemelk werd op  $40^{\circ}\text{C}$  gebracht, afgekoeld en met de koude room gemengd tot melk met 3,8 % vet (WT).
4. De room en de taptemelk werden gemengd en hierna op  $40^{\circ}\text{C}$  gebracht en weer afgekoeld (WM).



Deze melken werden nu bij 5° C in glazen cylinders weggezet en na 20 uur werd de oprooming bepaald:

	Vet % onderm.	Roomlaag in mm.	Vet % roomlaag	% opgeroomd vet
KM	2,4	11	18	36
WR	2,2	11	20	42
WT	1,0	21	19	75
WM	0,7	21	21	83

Wij zien dus dat de fysische toestand van het vet een zeer geringe, de ondermelk daarentegen de hoofdrol speelt.

De reversibele viscositeitsverandering van taptemelk bij koude en warmte kon m. i. niet geheel de feiten verklaren en daar een eventueele rol van het opgeloste calcium bij de agglutinatieprocessen niet bekend is, is een verklaring hierdoor niet mogelijk.

Een feit blijft echter een zekere analogie tusschen deze oproomingsverschijnselen en de boven besproken verschijnselen.

### 5. Verdunnen der melk.

Bij verdunning van melk wordt de concentratie aan opgeloste Ca en PO<sub>4</sub> geringer. Bij onze proeven met gist zagen wij, dat het caseïnaatcomplex dit tekort weer wil aanzuiveren.

Verdunnen wij dus melk met gedestilleerd water, dan zal het gevolg zijn, dat kalk aan het complex wordt onttrokken. Dit moet weer tot gevolg hebben, dat de micellen kleiner worden. Bij genoegzame verdunning van taptemelk met water (1 : 100) krijgt men een troebelwitte vloeistof.

Laat men deze eenige uren staan, dan verdwijnt de troebeling en wordt de vloeistof glashelder, zooals werd geconstateerd door Schneck (63). De deeltjes vallen dus uiteen tot veel kleinere partikeltjes, waardoor de vloeistof helder wordt.

Men zou bij verdunning in het serum dus een hogere Ca- en PO<sub>4</sub>-concentratie moeten vinden dan uit de verdunning van het oorspronkelijk gehalte aan opgeloste kalk en fosphaat zou moeten worden verwacht.

Nu heeft door verdunning met water een geringe pH verhoging der melk plaats en dit gaat gepaard met een vermindering der overrun (o) en een vermeerdering van het colloïdale triphosphaat, zooals Eilers aantoonde.

### Titraties volgens Ling van ondermelk met verlaagde zuurtegraad

Zuurtegraad Th.	17,7	15,0	0,5
serumaciditeit	8,2	6,9	4,3
overrun	2,7	2,0	1,0
triphosphaat	8,8	9,4	10,6

Bij pH 7,2 zou al het overschot aan opgeloste kalk en fosphaat uit het serum zijn verdwenen.

Door de verhoging in pH der verdunde melk wordt het onderzoek precair, daar wij met een tweede effect te maken krijgen, dat de uitwerking van het eerste effect te niet kan doen. Immers door dat tweede effect krijgen wij juist een verlaging van het opgeloste Ca en PO<sub>4</sub>, zoodat wij alleen dan in staat zijn onze hypothese op deze manier te toetsen, wanneer het eerste effect het tweede overtreft. Vinden wij echter een vermindering van het gehalte aan Ca en PO<sub>4</sub> in de continue phase, dan beteekent dit nog niet dat onze hypothese niet juist zou zijn. Daar verdunde melk niet meer met leb stremt, moest van de supercentrifuge gebruik gemaakt worden. De melk werd 1 : 2 met water verdund en nadat zij een nacht in de ijskast gestaan had, op weicalcium en wei-PO<sub>4</sub> geanalyseerd, op de wijze vroeger reeds beschreven.



Opgelost in het serum

	drst.	pH	Ca	PO <sub>4</sub>
melk onverdund	8,95	6,70	0,035	0,125
melk 1:2 verdund	3,06	6,93	0,013	0,043

Bij de verdunde melk hadden wij zonder afsplitsing of neerslaan door verhoogde pH moeten vinden:

$$\frac{3,06}{8,95} \times 0,035 = 0,0119 \text{ Ca en } \frac{3,06}{8,95} \times 0,123 = 0,041 \text{ PO}_4$$

Er valt dus een kleine vermeerdering te constateeren.

De proef werd nog eens herhaald, waarbij wij echter de melk 1 : 5 met water verdunden:

Melk	Caseïne	opgeloste Ca	opgeloste PO <sub>4</sub>
onverdund	2,59	0,0354	0,1222
1:5 verdund	0,52	0,0082	0,0262

Het verdunde serum zou hebben moeten bevatten:

$$\frac{0,52}{2,59} \times 0,354 = 0,0071 \text{ Ca en } \frac{0,52}{2,59} \times 0,1222 = 0,0254 \text{ PO}_4$$

Ook hier is dus weer het serum der verdunde melk rijker aan opgeloste Ca en PO<sub>4</sub> dan wij mochten verwachten, indien er geen afsplitsing had plaats gevonden.



## SAMENVATTING.

In het voorgaande wordt uitvoerig de literatuur besproken over de vorm waarin het colloïdale fosphaat in melk aanwezig is. Uit het uitvoerige analysemateriaal van Van Slyke & Bosworth zou blijken, dat dit fosphaat als het secundaire-calciumzout aanwezig is. Omgerekend met betere gegevens over het gehalte der caseïne aan P en over het gehalte aan Ca van calcium-caseïnaat bij pH 6,7, laten deze cijfers echter zien, dat ongeveer tricalciumfosphaat aanwezig moet zijn.

De meer recente auteurs komen dan ook alle tot de conclusie, dat het colloïdale fosphaat grootendeels als het tertiaire-calciumzout aanwezig is. Was men oorspronkelijk van oordeel, dat dit fosphaat door de caseïne als schutcolloïd in suspensie wordt gehouden, later wordt de meening naar voren gebracht dat het door een soort dubbelverbinding aan het calcium-caseïnaat is gehecht, waarbij het caseïnecalcium als medium optreedt.

Zoowel uit de onderzoeken van Ling als uit het eigen werk blijkt, dat het calcium van de caseïne een andere positie moet innemen in het calciumcaseïnaatfosphaatcomplex dan het Ca van het colloïdale fosphaat, wat moeilijk te verklaren is zoo men de dubbelverbinding aanneemt.

Uit de resultaten van het eigen werk wordt ook aannemelijk gemaakt, dat de aminogroepen althans die van lysine, een rol bij de binding van het colloïdale calciumfosphaat aan de caseïne spelen.

Het met uiteenlopende methoden door verschillende auteurs bepaalde gehalte aan caseïnecalcium blijkt aequivalent te zijn met het gehalte aan het esterfosphaat der caseïne.

Met deze gegevens voor oogen stel ik mij het calciumcaseïnaat-calciumfosphaatcomplex aldus voor:

Het caseïnecalcium is aan de esterfosphaatgroepen gebonden, terwijl de overige ladingscentra op het eiwitoppervlak met calcium en fosphaat bezet zijn. Dat dit juist in de verhouding  $3\text{Ca}$  tot  $2\text{PO}_4$  zal geschieden, zou wel zeer toevallig zijn. Uit de literatuur blijkt dan ook, dat dit niet precies het geval is, doch dat steeds kleine schommelingen om die verhouding worden gevonden. Dit aan de ladingscentra gebonden calcium en fosphaat is in evenwicht met het in de continue phase opgeloste. Aangetoond wordt dat bij verwarming van melk het opgeloste calcium en fosphaat gedeeltelijk als  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  precipiteert en dat het in deze vorm aan de caseïne wordt geadsorbeerd.

Naar analogie van de processen, die bij verwarming van melk met hierin gesuspendeerde gisten optreden, wordt aannemelijk gemaakt, dat bij verwarming van melk het op de ladingscentra der caseïne aanwezig calcium en fosphaat, via de continue phase, gedeeltelijk wordt omgezet in geprecipiteerd  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  en dat het in deze vorm opnieuw door de caseïne wordt geadsorbeerd.



## LITERATUURLIJST

1. Guittonneau, G. & Brigando, J. Le Lait 16, 577, 1936
2. Porcher, Ch. Le lait au point de vue colloidal. Lyon 1930
3. Hammarsten, O. Bied. Centr. 147, 1879
4. Söldner, D. Landwirtsch. Versuchstat. 35, 351, 1888
5. Lehmann, J. Pflüg. Arch. 56, 558, 1894
6. Van Slyke, L. L. & Bosworth, A. W. Techn. Bul. N. Y. Agric. Exp. Sta. 37 & 39, 1914
7. Van Slyke, L. L. & Bosworth, A. W. Techn. Bul. N. Y. Agric. Exp. Sta. 26, 1912
8. Van Slyke, L. L. & Bosworth, A. W. Journ. of Biol. Chemistry 19, 67, '14
9. Van Slyke, L. L. & Baker, J. C. New York Agric. Exp. Sta. Techn. Bul. 65, 1918
10. Hammarsten, O. Z. f. Physiol. Chemie. 7, 227, 1883
11. György, P. Bioch. Z. 142, 1, 1923
12. Wright, N. C. J. of Agrci. Sc. 18, 478, 1928
13. Holt, L. E., La Mer, V. K. & Chown, H. B. J. Biol. Chem. 63, 509, 1925
14. Pyne, G. Th. Bioch. J. 26, 1006, 1932
15. Steineggar Z. Unters. Nahr. Genuszm. 10, 659, 1905
16. Richmond, D. Analyst, 36, 9, 1911
17. Roeder, H. & Radoi Milchwirtsch. Forsch. 20, 139, '25
18. Pyne, G. Th. Bioch. J. 28, 1940, 1934
19. De Toni, G. Kolloid. Zeitschr. 142, 1, 1923
20. Kometiani, P. A. Milchwirtsch. Forsch. 12, 433, 1931
21. Pyne, G. Th. & Ryan, J. J. Proc. Roy. Soc. Dublin 20 (N.S.), 471, 1932
22. Porcher, Ch. & Chevallier Le Lait, 3, 188, 1923
23. Ling, E. R. Dairy Research, 7, 145, 1936
24. Ling, E. R. Dairy Research, 8, 172, 1937
25. De Kadt, G. S. & v. Minnen, G. Rec. Trav. Chim. des P. B. 2, 257, 1943
26. Palmer, L. S. & Richardson, G. A. Third Colloid Symp. Mono Chem. Catal. Co. N. Y., 1925
27. Powell, E. M. & Palmer, L. S. J. Dairy Sc. 18, 401, 1935
28. Stassano, H. & Talarico, J. Compt Rend. Soc. Biol. 9, 254, '10
29. Rupp, P. U. S. Dept. Agric. Bur. Animal Ind. Bul. 166, 1913
30. Matick, E. C. V. & Hallett, H. S. J. Agr. Sci. 19, 452, 1929
31. Guittonneau, M. G. & Bèjambes, M. Le Lait 19, 225, 1939
32. Kossa Précis microscopie, p. 795, 1921
33. Breed, R. S. Zentr. f. Bakt. Bd. 30, 337, 1911
34. Van der Burg, P. & de Kadt, G. S. & van Kreveld, A. Handelingen Genootschap v. Melk-kunde 1939
35. Freundlich, H. Kapillarchemie, Bd. 1, Leipzig 1932
36. Boekhout & de Vries Landw. Vers. Stat. 55, 201, 1901
37. Purvis, Brehant & Mc. Hattie J. Roy. San. Inst. 33, 154, 1912
38. Grosser Bioch. Z. 48, 427, 1913
39. Diffloth Bull. Sci. Pharmacol. 10, 273, 1904
40. Milroy Bioch. J. 9, 215, 1915
41. Bell J. Biol. Chem. 64, 391, 1925
42. Magee & Harvey Bioch. J. 20, 373, 1926
43. Orr, J. B., Crichton, A., Haldane, J. B. & Middleton, W. Scottish J. Agric. 9, 377, 1926
44. Allen, L. A. Hannah Dairy Res. Inst. Bul. 3, 1932



45. Leighton, A. & Mudge, C. S. *J. Biol. Chem.* 56, 53, 1923
46. Hardy *J. Physiol.* 24, 158, 1899
47. Chick, H. N. & Martin, C. J. *J. Physiol.* 40, 404; 43, 1; 45, 61; 1910/1912
48. Lepeschkin, W. W. *Bioch. J.* 16, 678, 1922
49. Wu, H. & Wu, D. Y. *J. Biol. Chem.* 64, 369, 1925
50. Lewis *Bioch. J.* 20, 965, 978, 984, 1926
51. Orla Jensen, S. & Plattner, E. *Le Lait* 4, 361, 388, 419, 1905
52. Freundenreich, E. V. *Le Lait*, 4, 433, 1905
53. Weinlig *Forsch. Geb. Milch. Milkereiw.* 2, 127, 175, 1922
54. Grimmer, W., Kurtenacker, C. & Berg, R. *Bioch. Z.* 137, 465, 1923
55. Rowland, S. J. *Dairy Res.* 5, 36, 1933; 8, 1, 6, 195, 1937
56. Devaux *J. Phys.* 3, 450
57. Metcalf *Z. Phys. Chem.* 52, 1, 1905
58. Eilers, H. *Rapport der B. P. M., F. N. Z.*, '43
59. Whittier, E. O. & Benton, A. G. *J. Dairy Sci.* 10, 1926, 1927
60. Bernhauer, K. & Wolf, H. *Bioch. Z.* 219, 232, 1930
61. Ballowitz, K. *Bioch. Z.* 256, 64, 1932
62. Whitaker, R., Sherman, J. M. & Sharp, P. F. *J. Dairy Sci.* 10, 361
63. Schneck, A. *Milch. Forsch.* 7, 1, 1929
64. Schneck, A. *Lehrbuch der organischen Chemie* 1941
65. Waldschmidt Leitz, E. *Chem. Weekbl.* 27, 266, 1930
66. Bjerrum, N. *Z. Physik. Chemie*, 104, 147, 1923
67. Posternak, S. *Compt. rend. Acad. Sci.* 184, 306, 1927. 187, 313, 1928
68. Rimington, C. *Bioch. J.* 21, 1179, 1927
69. Levene, P. A. & Hill, D. W. *J. Biol. Chem.* 101, 71, 711, 1933
70. Lipmann, F. *Naturwissenschaften*, 21, 236, 1933
71. Committee on protein nomenclature *Bioch. Z.* 262, 3, 9, 1933
72. Sutermeister, E. & Browne, L. *J. Biol. Chem.* 1, 142, 1908
73. Hammarsten, O. *Casein and its industrial applications.* 1939
74. Tangl, F. *Zeitschr. physiol. Chem.* 7, 227, '83
75. Svedberg, T., Carpenter, L. & Carpenter, D. C. *Pflügers Arch.* 121, 534, 1908
76. Philpot, F. J. & Philpot, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* 52, 241, 1930
77. Bergmann, M. & Niemann, C. *Proc. Roy. Soc. London*, 127, 21, '39
78. Linderstrøm—Lang *J. Biol. Chem.* 115, 77, 1936; 118, 301, 1937; 122, 677, 1938
79. Bergman, M. *Ergeb. d. Pysiol.* 35, 115, 1933
80. Rimington, C. & Kay, H. D. *J. Biol. Chem.* 110, 471, 1935
81. Robison *J. Soc. Chem. Ind.* 44, 256, 1925
82. Schmidt, G. *Bioch. J.* 20, 777, 1926
83. Lloyd, J. & Shore, A. *Bioch. J.* 17, 286, 1923
84. Osborne, T. B. & Wakeman, A. J. *Z. Physiol. Chem.* 223, 86, 1933
85. Linderstrøm—Lang, K. *Chemistry of proteins*, 2nd. ed. 1938
86. Cherbulier, E. *J. Biol. Chem.* 33, 243, 1918
87. Groh, J. *Compt. Rend. Lab. Carlsberg, Ser.-biol.* 16, 1, 1925. 17, 1928
88. Sørensen, S. P. S. *Le Lait* 14, 132, 1934. 13, 264, 1933
89. Howat & Wright *Z. Physiol. Chem.* 226, 32, 1934
90. Rogers, Associ. of *Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg, ser. biol.* 18, 5, 1930
91. Wiegner, G. *Bioch. J.* 28, 1336, 1934
- Fundamentals of Dairy Sci.* 1928. p. 117. *Z. f. d. Nahr. und Genussm.* 43, 425, 1914